

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ASOCIACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA, LA INMUNOHISTOQUÍMICA Y LA  
EXPRESIÓN DE LOS ÁCIDOS RIBONUCLEICOS TEMPRANOS CODIFICADOS  
POR EL VIRUS EPSTEIN-BARR (EBER) EN EL LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS  
B GRANDES, EN PACIENTES MAYORES DE 50 AÑOS**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios  
de Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar al grado y título de Maes-  
tría Académica en Ciencias Biomédicas con Énfasis en Bioquímica y Fisiolo-  
gía Celular

KATTIA ESMERALDA ALPÍZAR MIRANDA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

## **DEDICATORIA**

A Benjamín, mi amado hijo. Espero mi trabajo y ejemplo sean una fuente de inspiración para tu vida y que logres metas mucho más ambiciosas que las mías.

“¿Amas la vida? No desperdicies el tiempo porque es la sustancia de la que está hecha”

Benjamin Franklin

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ernesto Jiménez Montero, jefe del Servicio de Patología del Hospital San Juan de Dios, por todo su apoyo desde el inicio de mi maestría.

A la Dra. Eva Moreno Medina, jefa del Servicio de Patología del Hospital México, por su colaboración para realizar las pruebas inmunohistoquímicas de dicho centro hospitalario.

A la Dra. Mónica Araya Rojas patóloga del HSJD y al Dr. Malcolm Acón Laws patólogo del HM, por su valiosa ayuda como tutores institucionales.

A la Dra. Rosario Espinoza Mora, tutora académica, por su importante motivación y guía para lograr concluir este proyecto.

A la Dra. Teresa Somogyi Pérez, al Dr. Cristian Pérez Corrales y al Dr. Evan Jensen Gamboa, por su apoyo como revisores de la tesis.

A Jason Ávila Sánchez, histotecnólogo del Hospital San Juan de Dios, por su ayuda en la realización de las pruebas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* cromogénica.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con Énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular.”

---

Dr. Javier Mora Rodríguez  
**Representante de Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**

---

PhD. María del Rosario Espinoza Mora  
**Directora de Tesis**

---

PhD. Teresita Somogyi Pérez  
**Asesora**

---

MSc. Cristian Pérez Corrales  
**Asesor**

---

PhD. Mariela Arias Hidalgo  
**Directora  
Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas**

---

Kattia Esmeralda Alpízar Miranda  
**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDOS

Portada.....	i
Dedicatoria y agradecimientos .....	ii
Hoja de aprobación .....	iii
Tabla de contenidos .....	iv
Resumen .....	vi
Abstract .....	vii
Lista de cuadros .....	viii
Lista de tablas .....	ix
Lista de figuras .....	x
Lista de abreviaturas .....	xi
Introducción .....	1
Linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	1
Linfoma difuso de células B grandes, virus Epstein-Barr positivo .....	5
Virus Epstein-Barr .....	11
Justificación del estudio .....	17
Diseño del estudio .....	19
Propósito del estudio .....	19
Objetivos del estudio .....	20
Metodología .....	21
Descripción de los procedimientos aplicados a seres humanos .....	26
Evaluación del riesgo/beneficio de la investigación .....	27
Consideraciones estadísticas .....	29
Identificación de participantes, reclutamiento y consentimiento .....	30
Control de calidad .....	30
Consideraciones bioéticas .....	30
Resultados .....	32
Linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	32
Variables sociodemográficas .....	32

Variables clínicas .....	33
Variables morfológicas .....	35
Variables inmunohistoquímicas .....	36
Expresión de EBER por hibridación in situ cromogénica .....	39
Linfoma difuso de células B grandes, EBER positivo .....	40
Comparación de la población en estudio según expresión de EBER .....	44
Variables sociodemográficas .....	44
Variables clínicas .....	45
Variables morfológicas .....	46
Variables inmunohistoquímicas .....	48
Discusión .....	54
Linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	54
Linfoma difuso de células B grandes, EBER positivo .....	56
Conclusiones .....	62
Bibliografía .....	64
Anexos .....	77
Hoja de recolección de datos .....	77

## RESUMEN

El linfoma difuso de células B grandes es el tipo más común de linfoma no Hodgkin, representando 30-40% de casos. La variante EBER positiva descrita por primera vez en 2003 por Oyama, fue reclasificada en la actualización de neoplasias linfoides de la OMS en el 2016. Esta variante se reporta principalmente en asiáticos y ascendencia latinoamericana, con una frecuencia de 8 a 15%. El presente estudio incluyó una serie de 214 casos provenientes de dos hospitales nacionales en Costa Rica. Se evaluaron características sociodemográficas, clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas, así como la prueba de hibridación *in situ* cromogénica para detección del ARN temprano del virus Epstein-Barr (EBER). Se encontró una frecuencia de 4,7% de la variante virus Epstein-Barr positivo, con edad media al diagnóstico de 69 años y predominancia en hombres. Se observó predominio de localización extraganglionar, siendo el tracto gastrointestinal, la piel, la amígdala y la glándula parótida los sitios más afectados. Se documentó infiltración de médula ósea en 10% de los casos. Los marcadores de inmunohistoquímica (CD20, BCL2, LMP1, CD30, MYC, BCL6, CD10, MUM1/IRF4) mostraron expresión de acuerdo a lo descrito en la literatura. Se documentó predominio del subgrupo de origen no centro germinal. Se demostró asociación significativa de la variable EBER categórica con expresión de BCL2, LMP-1, CD10, CD30 y diferenciación plasmacítica. La variable EBER nominal presentó asociación significativa con expresión de LMP-1, CD10, CD30 y subgrupo de origen.

## ABSTRACT

Diffuse large B-cell lymphoma is the most common type of non-Hodgkin lymphoma, accounting for 30-40% of cases. The positive EBER variant first described in 2003 by Oyama, was reclassified by the WHO lymphoid neoplasms update in 2016. This variant is reported mainly in Asians and Latin American descent, with a frequency of 8 to 15%. The present study included a series of 214 cases from two national hospitals in Costa Rica. Sociodemographic, clinical, morphological and immunohistochemical characteristics were evaluated, as well as the chromogenic *in situ* hybridization test for detection of the early RNA of the Epstein-Barr virus (EBER). A frequency of 4.7% of the Epstein-Barr virus positive variant was found, with a mean age at diagnosis of 69 years and predominance in men. A predominance of extranodal location was observed, with the gastrointestinal tract, skin, amygdala, and parotid gland being the most affected sites. Bone marrow infiltration was documented in 10% of the cases. Immunohistochemical markers (CD20, BCL2, LMP1, CD30, MYC, BCL6, CD10, MUM1 / IRF4) showed expression as described in the literature. The predominance of the subgroup of non-germinal center origin was documented. Significant association of the categorical EBER variable with expression of BCL2, LMP-1, CD10, CD30 and plasmacytic differentiation was demonstrated. The nominal EBER variable presented a significant association with expression of LMP-1, CD10, CD30 and subgroup of origin.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Porcentaje de corte para determinar positividad para EBER y frecuencia de linfoma difuso de células B grandes VEB positivo .....	7
<b>Cuadro 2.</b> Productos virales expresados y neoplasias asociadas a los diferentes programas de latencia viral .....	12
<b>Cuadro 3.</b> Anticuerpos utilizados para la tinción de inmunohistoquímica, según clonas y diluciones utilizadas .....	24
<b>Cuadro 4.</b> Variables categóricas y numéricas valoradas en este estudio .....	29



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Frecuencia absoluta y porcentual según sexo y lugar de residencia de los pacientes con linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	33
<b>Tabla 2.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de la variable clínica infiltración de médula ósea por el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	34
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia absoluta y porcentual según variables morfológicas en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	36
<b>Tabla 4.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de variables inmunohistoquímicas (BCL6, MUM1/IRF4, CD10) y subgrupo de origen, en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	37
<b>Tabla 5.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de variables inmunohistoquímicas en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	38
<b>Tabla 6.</b> Casos con expresión de EBER por hibridación <i>in situ</i> cromogénica (CISH) en el linfoma difuso de células B grandes: variables sociodemográficas, morfológicas y clínicas .....	41
<b>Tabla 7.</b> Casos con expresión de EBER por hibridación <i>in situ</i> cromogénica (CISH) en el linfoma difuso de células B grandes: variables inmunohistoquímicas .....	43
<b>Tabla 8.</b> Frecuencias absoluta y porcentual de las variables sociodemográficas sexo y lugar de residencia, en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER .....	44
<b>Tabla 9.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de la variable clínica infiltración de médula ósea por el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER .....	45
<b>Tabla 10.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de la localización anatómica en linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER .....	46
<b>Tabla 11.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de variables morfológicas en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER .....	47
<b>Tabla 12.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de BCL6, MUM1/IRF4 y CD10 por inmunohistoquímica en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER .....	48
<b>Tabla 13.</b> Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de variables inmunohistoquímicas en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER .....	49
<b>Tabla 14.</b> Asociación entre la variable expresión de EBER y resto de variables de interés: socio-demográficas, morfológicas, clínicas e inmunohistoquímicas .....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Algoritmo de Hans para clasificación del LDCBG por inmunoperoxidasa .....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura secundaria de EBERs y sus sitios potenciales de unión a proteínas .....	14
<b>Figura 3.</b> Esquema de los componentes del ciclo de vida latente de VEB y su contribución en la transformación de linfocitos B .....	16
<b>Figura 4.</b> Distribución porcentual según localización anatómica del linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	35
<b>Figura 5.</b> Distribución porcentual según la expresión de EBER por hibridación <i>in situ</i> cromogénica (CISH) en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación .....	39
<b>Figura 6.</b> Diagrama de cajas de las variables que mostraron dependencia con la variable expresión de EBER, según la prueba exacta de Fisher .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**BARTs:** micromoléculas de ácido ribonucleico codificadas en áreas latentes del virus Epstein-Barr

**BCL2:** protooncogén en 18q21.3, linfoma de células B número 2

**BCL6:** Factor de transcripción en 3q27, normalmente expresado en centros germinales

**BCR:** receptor de células B

**BHRF1:** micromoléculas de ácido ribonucleico codificadas en áreas líticas del virus Epstein- Barr

**BOB.1:** Factor de transcripción de células B, coactivador de OCT-2

**CD4:** marcador de células T colaboradoras, importante en activación de células T y receptor del virus de inmunodeficiencia humana

**CD5:** identificación de células T, pertenece a la superfamilia de receptores “carroñeros”

**CD8:** marcador de células T citotóxicas

**CD10 (CALLA):** metalopeptidasa de membrana celular ampliamente distribuida en células hematopoyéticas, antígeno común de leucemia linfoblástica aguda

**CD19:** Marcador común de células B

**CD20:** Marcador común de células B

**CD22 (BL-CAM):** Molécula de adhesión celular de linfocitos B

**CD30:** antígeno de activación de linfocitos, miembro de la familia de receptores de superficie celular del factor de necrosis tumoral

**CD79a (MB-1):** Marcador común de células B, expresa en estadios tempranos de diferenciación

**Ciclina D1 (BCL1, gen CCND1):** linfoma de células B número 1

**Ciclina D2 (gen CCND2):** proteína específica de las fases G1/S del ciclo celular

**CISH:** hibridación *in situ* cromogénica

**DHL:** deshidrogenasa láctica

**EBER:** ácidos ribonucleicos tempranos codificados por el virus Epstein-Barr

**EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP:** antígenos nucleares del virus Epstein-Barr

**FOXP1:** familia FOX de factores de transcripción

**GCB:** subgrupo centro germinal

**HM:** Hospital México

**HSJD:** Hospital San Juan de Dios

**IPI:** índice pronóstico internacional

**Ki67/MIB1:** marcador de proliferación celular, proteína nuclear lábil, no histona, expresada en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular

**LDCBG:** Linfoma difuso de células B grandes

**LLC:** leucemia linfocítica crónica

**LMP-1, LMP-2A, LMP-2B:** proteínas latentes de membrana del virus Epstein-Barr

**MUM1/IRF4 (proteína de mieloma múltiple 1 / factor regulador de interferón 4):** Factor de transcripción expresado en diferenciación final de células B del centro germinal y en células B post-centro germinal (centrocito tardío)

**MYC:** protooncogén en 8q24.1, produce una fosfoproteína nuclear de vida corta

**non-CGB (ABC):** subgrupo no centro germinal o activado

**NOS:** sin otra especificación

**OCT-2:** Factor de transcripción que activa la expresión del gen de inmunoglobulinas

**PAX-5 (BSAP):** Factor de transcripción, proteína activadora específica de células B

**PDL1:** ligando de muerte programada 1, miembro de la familia B7 de ligandos de superficie celular

**PDL2:** ligando de muerte programada 2, homólogo de PDL1

**R-CHOP:** terapia con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona

**SNC:** sistema nervioso central

**TGI:** tracto gastrointestinal

**TGU:** tracto genitourinario

**TLR:** receptor tipo Toll

**TRI:** tracto respiratorio inferior

**TRS:** tracto respiratorio superior

**VEB (HHV-4):** virus Epstein-Barr, herpesvirus tipo 4



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Kattia Esmeralda Alpizar Miranda, con cédula de identidad 2-0595-0734, en mi condición de autor del TFG titulado Asociación entre la morfología, la inmunohistoquímica y la expresión de los ácidos ribonucleicos tempranos codificados por el virus Epstein-Barr (EBER) en el Linfoma difuso de células B grandes, en pacientes mayores de 50 años

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO ☐

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Kattia Esmeralda Alpizar Miranda

Número de Carné: A20181 Número de cédula: 2-0595-0734

Correo Electrónico: kathy.eam@gmail.com

Fecha: \_\_\_\_\_ Número de teléfono: 8313-6271

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): María del Rosario Espinoza Mora

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## INTRODUCCIÓN

### LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES, SIN OTRA ESPECIFICACIÓN

Los linfomas son neoplasias del sistema linfático, que involucran tanto órganos primarios como secundarios. Se clasifican de acuerdo con los criterios dados por la Organización Mundial de la Salud en el 2001 y modificados en el 2016. Se dividen en cinco categorías principales: las neoplasias de células B maduras, las neoplasias de células T y NK maduras, los linfomas de Hodgkin, los desórdenes linfoproliferativos post-transplante y las neoplasias de células dendríticas e histiocíticas. Estas categorías se subdividen de acuerdo con estudios de inmunohistoquímica, genética molecular, genómica y proteómica. (Swerdlow et al., 2016, p. 2376)

En esta clasificación se encuentra en el apartado de neoplasias de células B maduras, en la categoría de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG). Este es el tipo más común de linfoma y representa una tercera parte de todos los casos de linfoma a nivel mundial. A su vez, este linfoma se subdivide en trece variantes, las cuales representan 20% de los casos. (Sukswai et al., 2020, p. 53)

El linfoma difuso de células B grandes es el tipo más común de todos los linfomas no Hodgkin, representando 30 a 40% de los casos. Se presenta tanto en niños como en adultos, siendo más prevalente en ancianos con edad media en la séptima década y con leve predominancia en hombres. (Hsi, 2018, pp. 271)

La presentación clínica se da como una masa tumoral de rápido crecimiento, con compromiso de uno o más sitios ganglionares y/o extraganglionares. Aproximadamente 40% de los linfomas se presentan como enfermedad extraganglionar, siendo el tracto gastrointestinal el sitio más común. Un tercio de los pacientes asocia síntomas B (fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna) y algunos síntomas relacionados al órgano comprometido. Frecuentemente se documenta aumento de deshidrogenasa láctica (DHL) y beta-2-microglobulina. 50% se presenta en estadios clínicos Ann Arbor I-II y el otro 50% en estadios III-IV. (Morrison et al., 2015, p. 143) La frecuencia de compromiso de la médula ósea es 10-20%, lo cual predice una peor supervivencia general. (Swerdlow et al., 2017, pp. 416)

La morfología muestra células grandes dispuestas en un patrón difuso, con borramiento total o parcial de la arquitectura normal del ganglio o sitio extraganglionar comprometido. Se puede observar fibrosis fina, esclerosis y necrosis geográfica. El índice mitótico es alto y la apoptosis

puede ser prominente, dando apariencia de cielo estrellado en 10% de los casos. Se observa un fondo variable de linfocitos T reactivos e histiocitos. (Xie et al., 2015, p. 57)

Las variantes morfológicas más comunes de este linfoma son centroblástica, inmunoblástica y anaplásica. La variante centroblástica es la más común, representando 80% de los casos. Los centroblastos son células grandes con moderada cantidad de citoplasma, con núcleo redondo u oval, cromatina vesicular y 2 a 3 nucléolos pequeños periféricos. Esta variante muestra un espectro de tumores monomórficos con predominio de centroblastos (>90%) y tumores polimórficos con mezcla de centroblastos (<90%), centrocitos e inmunoblastos. (B.-J. Chen et al., 2019, p. 3)

La variante inmunoblástica representa 8-10% de los casos y se define por la presencia de al menos 90% de inmunoblastos. El inmunoblasto es una célula grande, con citoplasma basofílico moderado-abundante y un nucléolo prominente central de forma trapezoide. Pueden presentar diferenciación plasmacítica. La variante anaplásica es menos común, representa 3% de todos los casos. Se caracteriza por células grandes o gigantes con núcleos pleomórficos o monstruosos. Estas células simulan células de Hodgkin, células de Reed-Sternberg y células anaplásicas. Esta variante frecuentemente tiene patrón sinusoidal parcial o extenso. (Li et al., 2018, p. 76)

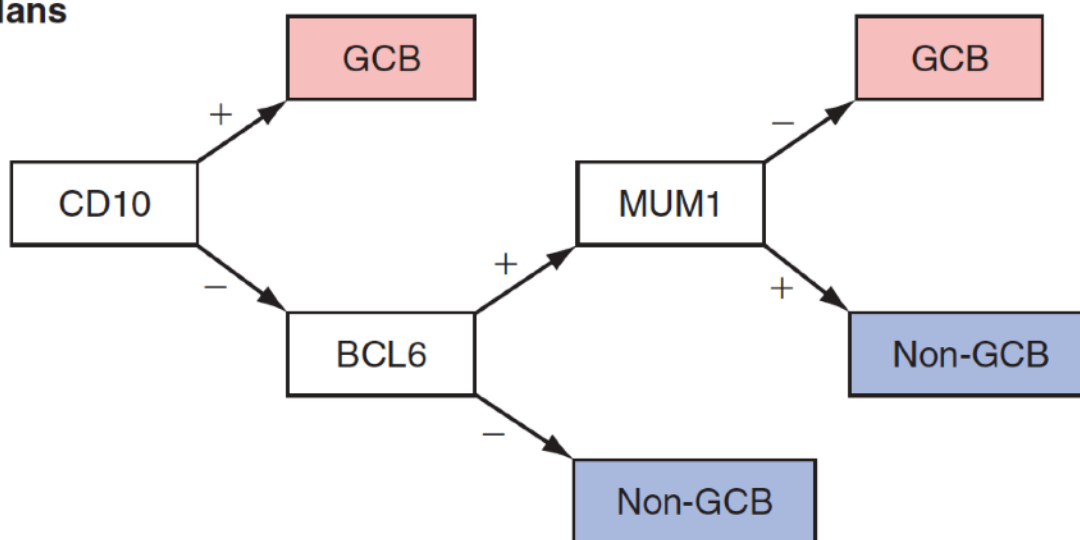
El perfil de inmunohistoquímica de esta neoplasia muestra expresión de marcadores de línea B como CD19, CD20, CD22 y CD79a, así como factores de transcripción de células B incluidos PAX-5, BOB.1 y OCT-2. Los antígenos de células T son negativos. Los antígenos que muestran expresión variable son BCL6 en 50 a 90% de casos, MUM1/IRF4 en 35 a 65% de casos, CD10 en 25 a 50% de casos, CD30 en 10 a 40% de casos, CD5 en menos del 10% de casos y ciclina D1 en 2% de casos con tinción débil y focal. Hay positividad para PD-L1/PD-L2 en 20-25% de los casos, lo que correlaciona con amplificación en el cromosoma 9p24.1. El índice de proliferación celular dado por la expresión de Ki67 es variable, con un rango de 30% a más de 95%. Otras proteínas con expresión variable son MYC en 30 a 50% de los casos con un corte de más de 40% de células positivas y BCL2 en 20 a 35% de los casos con un corte de más de 50% de células positivas. (Swerdlow et al., 2016, p. 2381)

Hans y colaboradores estudiaron 152 casos de pacientes con linfoma difuso de células grandes B de novo, con arreglos de tejidos y estudio de inmunohistoquímica con los marcadores CD20, CD10, BCL6, MUM1/IRF4, BCL2, ciclina D2 y FOXP1. De estos 82 casos eran hombres y 70 casos eran mujeres, con edad media de 63 años. Encontraron expresión de CD10 en 28%, BCL-6 en



56%, MUM1/IRF4 en 47%, ciclina D2 en 13%, BCL2 en 50% y FOXP1 en 61%. Se clasificaron 42% como subtipo centro germinal y 58% como subtipo no centro germinal (activado). Estos investigadores concluyeron que la expresión de CD10, BCL6, MUM1, BCL2 y ciclina D2 son predictores de supervivencia en este linfoma; y que la combinación de CD10, BCL6 y MUM1/IRF4 permite dividir el linfoma difuso en los subgrupos centro germinal y no centro germinal (activado). (**Ver figura 1.**) El valor predictivo positivo es de 87% para el tipo centro germinal y de 73% para el tipo activado, según microarreglos de ADN. (Hans, 2004, p. 277)

### Hans



**Figura 1. Algoritmo de Hans para clasificación del LDCBG por inmunoperoxidasa.**

GCB: subgrupo centro germinal, non-CGB: subgrupo no centro germinal o activado, LDCBG: linfoma difuso de células B grandes. Tomado de Hsi, 2018, pp. 275.

El estudio de perfiles de expresión génica ha demostrado la heterogeneidad molecular del linfoma difuso de células B grandes NOS, permitiendo la segregación en tres subtipos basados en similitudes con tipos de células normales: centro germinal (GCB) representa 45 a 55% de casos, activado (ABC) representa 35 a 45% de casos y no clasificable (tipo 3) representa 10% de casos. (Menon et al., 2012, p. 412) El subtipo GCB asocia reordenamiento de *BCL2* en la forma de t(14;18)(q32;q21) (IGH-BCL2) en 35 a 45% de casos y reordenamiento *MYC* en 10% de casos. (Velankar et al., 2018, p. 239) Así como mutaciones o deleciones recurrentes en genes asociados con regulación epigenética (*EZH2*, *CREBBP*, *EP300*, *MLL2*, *MLL3*, *MEF2B* y *TET2*) y mutaciones recurrentes en genes asociados con el receptor de células B (BCR), el receptor Toll-like (TLR) y las vías de señalización NF-κB (*CARD11*, *CD79A*, *CD79B*, *MYD88*, *TNFAIP3* y *NFKBIE*). También

se identifican mutaciones recurrentes en las vías de reparación del ADN / integridad genómica (*TP53*) en 10% a 20% de los casos. La mutación *EZH2* es exclusiva de subgrupo GCB y se encuentra en aproximadamente 20% de los casos. (Jaffe et al., 2016, pp. 425)

El subtipo ABC presenta reordenamientos de genes 3q27/BCL6; ganancias/amplificaciones de BCL2 y MYC; mutaciones o deleciones recurrentes en genes asociados con la señalización del receptor tipo Toll (TLR), la señalización de NF- $\kappa$ B y las vías de señalización del receptor de células B (*MYD88*, *TNFAIP3*, *CD79A*, *CD79B*, *CARD11* y *NFKBIE*); mutaciones y deleciones recurrentes en genes relacionados con modificación epigenética (*CREBBP*, *TET2*, *EP300*, *MLL2* y *MLL3*); mutaciones recurrentes en las vías de reparación del ADN/integridad genómica (*TP53*) en 10% a 25% de los casos. Las mutaciones *PRDM1* / *BLIMP1* son exclusivas del tipo ABC y se encuentran en aproximadamente 25% de los casos. (Hsi, 2018, pp. 276)

La diferencia en la evolución clínica refleja la significancia de la heterogeneidad molecular del LDCBG NOS. La mayoría de los pacientes responden a la terapia R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona). (Coiffier et al., 2002, p. 235) (Oki et al., 2015, p. 152) Sin embargo, los avances en biología molecular conducen a la identificación de nuevos objetivos terapéuticos que ofrecen una terapia más precisa y personalizada que los regímenes estándar de quimioterapia/ inmunquimioterapia. (Guo et al., 2018, p. 85)

- **Linfoma difuso de células B grandes virus Epstein-Barr positivo**

El linfoma difuso de células B grandes virus Epstein-Barr positivo, objeto de estudio del presente trabajo de investigación observacional, representa una de las variantes que cambiaron desde la clasificación de 2008, donde se incluía como categoría provisional denominado linfoma difuso de células B grandes, virus Epstein-Barr positivo del adulto. Sin embargo, los nuevos estudios han demostrado que se presenta en pacientes jóvenes, con un amplio espectro morfológico y mejor supervivencia. (Swerdlow et al., 2016, p. 2381)

El linfoma difuso de células B grandes virus Epstein-Barr positivo (LDCBG VEB+) es una neoplasia clonal de células B que requiere para su diagnóstico confirmar positividad para virus Epstein-Barr. (Marques-Piubelli et al., 2020, p. 40) (Velankar et al., 2018, p. 241)

Fue descrito por primera vez en el 2003 por Oyama y colaboradores, en adultos mayores japoneses sin historia de inmunodeficiencia, inmunosupresión, linfoma previo, trasplante o enfermedad autoinmune; lo cual sugería relación con deterioro del sistema inmune asociado con la edad. (Oyama et al., 2003, p. 18 ) Se considera un diagnóstico de exclusión, posterior a la verificación de que no se ajusta a los criterios que definen otras variantes. (Martelli et al., 2013, p. 169) (Grimm & O'Malley, 2019, p. 7)

Esta entidad se ha descrito principalmente en asiáticos y ascendencia latinoamericana, por lo que se requieren estudios para determinar su incidencia en otras poblaciones. (Martelli et al., 2013, p. 149) (Grimm & O'Malley, 2019, p. 7) La frecuencia reportada es de 8 a 15% de todos los linfomas difusos de células B grandes. (Adam et al., 2011, p. 349) (Ahn et al., 2013, p. 777) El índice de positividad para virus Epstein-Barr es proporcional al aumento de la edad, siendo 20-25% en pacientes mayores de 90 años. (Martelli et al., 2013, p. 151)

La edad media de presentación es de 71 años, con una proporción entre hombres y mujeres de 1,4. (Ng & Khoury, 2009, p. 47) Los estudios clínicos revelan en ancianos un curso clínico con deterioro rápido, pobre respuesta al tratamiento, pobre supervivencia y pobre pronóstico. Con una supervivencia media de 2 años y una supervivencia a 5 años de 25%. (Grimm & O'Malley, 2019, p. 7) Se han asociado como factores de mal pronóstico los síntomas B y edad mayor a 70 años. Se presentan con alto puntaje del índice pronóstico internacional (IPI), niveles elevados de deshidrogenasa láctica (DHL), estadio clínico avanzado y alta tasa de afectación extragan-

glionar, siendo los sitios más afectados el tracto gastrointestinal (TGI), la piel y la médula ósea. (Eminger et al., 2015, p. 24)

En pacientes jóvenes inmunocompetentes, hay predominio de enfermedad ganglionar y el pronóstico es excelente con una remisión a largo plazo mayor a 80% de los casos. (Grimm & O'Malley, 2019, p. 7) (Velankar et al., 2018, p. 241)

El estudio histológico de las biopsias de este linfoma muestra un espectro morfológico amplio, con superposición con varias otras entidades de linfoma de células B y T. Se describen células B grandes con morfología similar a centroblastos, inmunoblastos, plasmablastos, células de Hodgkin/Reed-Sternberg o células muy pleomórficas. (Castillo et al., 2016, p. 532) Cuando estas células se disponen de forma dispersa y se acompañan de células inflamatorias mixtas (linfocitos pequeños, histiocitos, células plasmáticas, eosinófilos, células epitelioides), el fenotipo se denomina polimorfo. Se debe hacer diagnóstico diferencial con linfoma de Hodgkin y linfoma de células B grandes rico en células T e histiocitos. (Montes-Moreno et al., 2012, p. 970)

Cuando las células se disponen formando sábanas de células B grandes, el fenotipo se denomina monomorfo. Se debe hacer diagnóstico diferencial con las variantes de linfoma difuso de células B grandes. (Wong & Wang, 2009, p. 337) En ambos subtipos se describen áreas de necrosis geográfica y focos de angioinvasión/angiocéntricos. El subtipo polimorfo similar a linfoma de células B grandes rico en células T e histiocitos predomina en pacientes jóvenes. (Velankar et al., 2018, p. 241)

El estudio de inmunohistoquímica muestra que las células grandes son de línea B con positividad para CD20, CD79a, PAX5 y OCT2. Estas células tienen expresión variable de CD30 (40%) y positividad para MUM1/IRF4, correspondiendo al fenotipo no centro germinal (non-GCB) o activado. Son negativas para CD10, CD15 y BCL6. (Velankar et al., 2018, p. 241) La expresión de LMP-1 y EBNA2 se ha identificado en 66% y 33% de los casos, respectivamente. (Castillo et al., 2011, p. 92)

La mayoría de las células neoplásicas están infectadas por virus Epstein-Barr, lo cual se demuestra con positividad para ácidos ribonucleicos tempranos codificados por el virus (EBER). El estudio de hibridación *in situ* cromogénica para EBER demuestra mayor sensibilidad que la inmunotinción para LMP-1. (Grimm & O'Malley, 2019, p. 7) Se ha utilizado diferentes porcentajes de corte para determinar positividad para EBER, se presenta una tabla resumen de los diferentes

estudios sobre el linfoma difuso de células B grandes VEB positivo. (Castillo et al., 2016, p. 534)

(Ver cuadro 1)

**Cuadro 1. Porcentaje de corte para determinar positividad para EBER y frecuencia de linfoma difuso de células B grandes VEB positivo.**

Fuente del estudio	% corte para EBER	n (%) casos positivos	País
<b>América</b>			
(Aguilar et al., 2015, p. 61)	> células	1	Perú
(Beltran, Castillo, Morales, et al., 2011, p. 663)	> 20%	39 (19,6%)	Perú
(Beltran, Castillo, Salas, et al., 2011, p. 154)	> 80%	2	Perú
(Beltrán et al., 2011, p. 287)	> células	5	Perú
(Cannatella et al., 2020, p. 200379)	No se reporta	1	EEUU
(Cohen et al., 2012, p. 1574)	> 20%	10 (40%)	Argentina
(Cohen et al., 2014, p. 2818)	5-10% > 20%	8 (10,7%) 7 (9,3%)	Argentina
(Dojcinov et al., 2011, p. 4728)	> 2/mm2	33 (27%)	EEUU*
(Gibson & Hsi, 2009, p. 655)	> 80%	5 (5,3%)	EEUU
(Hofscheier et al., 2011, p. 1047)	> células	9 (6,7%) 4 (2,4%)	México, Alemania
(Jamal et al., 2014, p. 266)	> 30%	5 (3,7%)	EEUU
(Miller et al., 2010, p. 379)	> células	3	EEUU
(Morales et al., 2009, p. 68)	No se reporta	11 (15%)	Perú
(Ok et al., 2014, p. 2339)	> 10%	28 (4%)	EEUU
(Wang et al., 2012, p. 365)	Células dispersas	1	EEUU
(Wang et al., 2014, p. 63)	> células	1	EEUU
(Zoroquiain et al., 2012, p. 332)	No se reporta	1	Chile

Fuente del estudio	% corte para EBER	n (%) casos positivos	País
<b>Asia</b>			
(Ahn et al., 2013, p. 775)	> 50%	18 (8.1%)	Corea
(Aladily et al., 2019, p. 151406)	> 10%	5 (10%) 6 (12%)	Jordania Turquía
(Asano et al., 2009, p. 2630)	> 50%	34 (100%)	Japón
(Au et al., 2006, p. 111)	No se reporta	1	China
(Chang et al., 2013, p. 327)	> 10%	15 (4,5%)	Taiwán
(Cho et al., 2008, p. 186)	> 20%	169 (23%)	Corea
(Chuang et al., 2010, p. 535)	> células	1	Taiwán
(Hong, Yoon, et al., 2015, p. 549)	> 20%	13 (6,7%) <50 a 35 (9,3%) >50 a	Corea
(Hwang et al., 2011, p. 354)	> células	1	China
(Ito et al., 2014, p. 149)	> células	1	Japón
(Kato et al., 2014, p. 538)	No se reporta	25 (41%)	Japón
(Kunitomi et al., 2014, p. 53)	No se reporta	1	Japón
(Kuze et al., 2000, p. 1235)	> células	13 (11,4%)	Japón
(Lee et al., 2013, p. e332)	No se reporta	1	Corea
(C.-H. Lu et al., 2014, p. 1165)	> 20%	15 (16,9%)	Taiwán
(T.-X. Lu et al., 2015, p. 12168-6)	> 20% > 50%	35 (14%) 26 (10,4%)	China
(Mizuno et al., 2013, p. 274)	No se reporta	1	Japón
(Ok et al., 2015, p. 13940)	> 10%	16 (3%) < 50a 30 (5,6%) > 50a	-
(Oyama et al., 2003, p. 20)	> células	22 (5,5%)	Japón
(Oyama et al., 2007, p. 5126)	> 50%	243 (14%)	Japón
(Ozsán et al., 2013, p. 472)	> 30%	8 (5,5%)	Turquía

Fuente del estudio	% corte para EBER	n (%) casos positivos	País
(Pan et al., 2012, p. 299)	> 50%	10 (4,7%)	China
(Park et al., 2007, p. 973)	> 20%	34 (9%)	Corea
(Purwanto et al., 2006, p. 79)	No se reporta	24 (100%)	Indonesia
(Sato et al., 2014, p. 1171)	> 30%	18 (6,9%)	Japón
(Shimoyama et al., 2008, p. 1086)	No se reporta	156 (8,7%)	Japón
(Shimoyama et al., 2009, p. 836)	No se reporta	147 (8,2%)	Japón
(Song et al., 2015)	No se reporta	16 (7%)	China
(Sugita et al., 2010, p. 272)	No se reporta	6 (10,5%)	Japón
(Tokuda et al., 2008, p. 668)	> células	1	Japón
(Tsuji, 2010, p. 258)	No se reporta	1	Japón
(Uccini et al., 2015, p. 720)	> 50%	7 (3,1%)	Iraq
(UNER et al., 2011, p. 310)	> células	18 (5,3%)	Turquía
(Wada et al., 2010, p. 318)	> 5% >10% > 20% > 50%	26 (5,4%) 21 (4,3%) 16 (3,3%) 5 (1,1%)	Japón
(Xue et al., 2018, p. 727)	No se reporta	30 (100%)	China
(Yoshino et al., 2006, p. 164)	> 50%	4 (8%)	Japón
<b>Europa</b>			
(de la Hera Magallanes et al., 2011, p. 572)	No se reporta	1	España
(De Unamuno Bustos et al., 2014, p. 486)	> células	1	España
(Gebauer et al., 2014, p. 1101)	> 50%	26 (100%)	Alemania
(Hoeller et al., 2010, p. 355)	> 10%	8 (3,1%)	Suiza, Italia, Austria
(Martin et al., 2010, p. 191)	> células	1	Reino Unido
(Montes-Moreno et al., 2012, p. 972)	> 80%	47 (100%)	España**

Fuente del estudio	% corte para EBER	n (%) casos positivos	País
(Svec et al., 2012, p. 174)	100 %	1	Reino Unido
(Ziarkiewicz et al., 2015, p. 160)	> 5%	9 (12,2%)	Polonia
<b>Oceanía</b>			
(Nguyen-Van et al., 2011, p. 147)	> 20%	7 (100%)	Australia
(Nourse et al., 2012, p. 49)	No se reporta	22 (100%)	Australia

\* 1 caso de Italia, España, Singapur, Corea del Sur, Chile, 3 casos de Reino Unido

\* \* 1 caso de Perú, México, 2 casos Italia

Modificado de (Hong, Ko, et al., 2015, p. 393) (Ok et al., 2013, p. 329)

Se ha propuesto como mecanismo patogénico de esta entidad el deterioro inmunológico intrínseco del proceso de envejecimiento. (Castillo-Quan et al., 2015, p. 2) Algunas vías generales que se han planteado son la alteración de la respuesta efectora tanto de células B como de células T, la disminución de las células T naïve positivas para CD4 y en menor medida para CD8 y la pérdida en la diversidad de células T naïve. (Hakim & Gress, 2007, p. 183) (O'Connor et al., 2014, p. 334) Mediante estos mecanismos se conduce a la disminución del número y la función de las células T, con lo cual las células infectadas por el virus Epstein-Barr proliferan sin control por parte del sistema inmunológico. (Gutiérrez et al., 2011, p. 64)

En relación con la alteración de la inmunidad innata se describe disminución de la actividad de células NK, aumento progresivo de las concentraciones séricas de IL-6 producida principalmente por monocitos y macrófagos, así como del receptor soluble de IL-6, conduciendo a un estado pro-inflamatorio; y disminución de poblaciones periféricas de células dendríticas. (Sansoni et al., 2008, p. 62)

Las alteraciones de la inmunidad adaptativa se refieren a aumento progresivo y significativo de algunas clases de inmunoglobulinas y subclases de IgG, reducción del número total de linfocitos T CD3 positivos, marcada disminución de linfocitos B, aumento de citoquinas tipo 1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y tipo 2 (IL-4, IL-6, IL-10), llevando a un estado pro-inflamatorio crónico. (Shore & Ruvkun, 2013, p. 411)



## VIRUS EPSTEIN-BARR

El virus Epstein-Barr (VEB) o herpesvirus tipo 4 (HHV-4) fue el primer virus patogénico para humanos en el que se probó asociación con la patogénesis del cáncer. Este virus pertenece a la familia *Herpesviridae*, a la subfamilia *Gammaherpesviridae* y al género *Lymphocryptovirus*. (Grywalska & Rolinski, 2015, p. 291)

Este virus es un virus herpes humano ubicuo que infecta más de 90% de la población mundial. Capaz de infectar linfocitos B, células epiteliales escamosas, células epiteliales glandulares, células mioepiteliales, células de músculo liso, linfocitos T, linfocitos NK, células plasmáticas y células foliculares dendríticas. (Gulley & Tang, 2008, p. 280) Se asocia con gran variedad de neoplasias, dentro de ellos los linfomas oportunistas, llamados linfomas asociados a VEB. (Rowe & Zuo, 2010, p. 174) Se caracterizan por la proliferación de células infectadas monoclonales que expresan un número restringido de genes latentes virales. (Iwakiri, 2016, p. 30)

El VEB infecta persistentemente linfocitos B de huéspedes inmunocompetentes, a través de un ciclo de vida bifásico que comprende una infección latente en el reservorio de células de larga vida y reactivación lítica ocasional. (Thorley-Lawson & Gross, 2004, p. 1331) La reactivación transitoria de la infección y la replicación viral en células epiteliales de la nasofaringe, permite su propagación en el cuerpo y la infección latente de linfocitos B, con posterior manipulación de las vías de crecimiento, supervivencia y diferenciación y de esta manera alcanzar el compartimento de células B de memoria, el cual constituye el reservorio de infección a través de la vida. (Frost & Gewurz, 2018, p. 15)

En individuos asintomáticos el VEB reside en linfocitos B de memoria de vida larga, en un estado de latencia 0, sin expresión de proteínas virales. La infección de linfocitos B naïve conduce a su maduración y expansión, promoviendo la expresión completa de proteínas virales (programa de latencia III), incluidos seis antígenos nucleares (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP) y tres proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B). Las células B infectadas que entran al centro germinal expresan un número restringido de proteínas virales (EBNA-1, LMP-1, LMP-2), siendo el programa de latencia II. Los linfocitos B infectados que escapan del programa de apoptosis, gracias a señales de supervivencia de LMP-1 y LMP-2, salen del centro germinal como células B de memoria con programas de latencia 0 o I (únicamente expresan EBNA-1). (Dolcetti, 2015, p. 58)

Los diferentes programas de latencia se asocian a la patogénesis de tipos particulares de cáncer. (Roschewski & Wilson, 2012, p. 76) La latencia I se observa en linfoma de Burkitt y cáncer gástrico. La latencia II ocurre en el linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo y linfocitosis hemofagocítica. La latencia III se identifica en desórdenes linfoproliferativos post-trasplante asociados a VEB, linfomas relacionados con síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) y líneas celulares linfoblastoides. **(Ver cuadro 2)** Debido a la infección preferencial de linfocitos B, las formas más comunes de desórdenes linfoproliferativos asociados a VEB son los linfomas de células B, incluido el linfoma difuso de células B grandes. (Grywalska & Rolinski, 2015, p. 292)

**Cuadro 2. Productos virales expresados y neoplasias asociadas a los diferentes programas de latencia viral**

Latencia	Productos virales	Neoplasias asociadas
Tipo I (sólo EBNA-1)	EBERs BARFO EBNA-1	Células B de memoria Linfoma Burkitt Cáncer gástrico
Tipo II (programa por defecto)	EBERs BARFs EBNA-1 LMPs	Células B centro germinal Carcinoma nasofaríngeo Linfoma de Hodgkin clásico
Tipo III (programa de crecimiento)	EBERs BARFs BHRF1s EBNAs LMPs	Células B naïve Líneas linfoblastoides Enf. linfoproliferativas en inmunosupresos (PTLD, linfoma no Hodgkin SNC, linfomas VIH) LDCBG

Modificado de Elgui de Oliveira et al., 2016, p. 653 y Forte & Luftig, 2011, p. 1157.

### **Rol de los antígenos latentes en la transformación de linfocitos**

#### **• Proteínas latentes de membrana**

LMP-1 es la principal oncoproteína del virus Epstein-Barr, la cual funciona como un receptor del factor de necrosis tumoral constitutivamente activo, simulando al receptor CD40 activado. Tiene funciones pleiotrópicas que promueven activación de células B, adhesión homotípica y heterotípica de células, expresión de moléculas de superficie (CD23, CD39, CD40, CD44) y moléculas de adhesión (LFA1, ICAM1, LFA3). (Dolcetti, 2015, p. 59) Además, aumenta las proteínas anti-

apoptóticas y suprime la senescencia celular. Así mismo, activa múltiples vías de señalización celular que conllevan a immortalización de linfocitos B, como MAPK/ERK, Wnt, JNK, PI3K/AKT y NF- $\kappa$ B. (Grywalska & Rolinski, 2015, p. 293)

El gen LMP-2 codifica dos isoformas de proteínas integrales de membrana hidrofóbicas, las cuales se originan de diferentes promotores debido a la circularización del genoma del virus. LMP-2A interfiere con múltiples vías de señalización celular, incluidas PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B, Wnt- $\beta$ -catenina y Jak/STAT. **(Ver Figura 3)** Simula el receptor de células B (BCR) activado, promoviendo un estímulo constitutivo de supervivencia para linfocitos B infectados. Contribuye a la migración de células B infectadas hacia tejidos linfoides. Bloquea la señalización a través del BCR que conlleva la reactivación lítica. LMP-2B afecta la regulación de la transducción de señal vía BCR controlada por LMP-2A, estimulando reactivación de linfocitos B infectados. (Elgui de Oliveira et al., 2016, p. 658)

#### • Antígenos nucleares

EBNA-1 es una proteína nuclear de unión al ADN, crítica en la replicación y mantenimiento de los episomas del virus Epstein-Barr y en la transactivación de su propia expresión y de otros genes de latencia importantes para la immortalización celular. (Chatterjee et al., 2019) Aumenta la supervivencia celular, la inestabilidad genómica y la respuesta al daño del ADN. **(Ver Figura 3)** Induce la expresión de las recombinasas RAG1 y RAG2. Tiene efecto anti-apoptótico, como consecuencia del bloqueo de la interacción de la proteasa ubiquitina específica asociada a virus herpes (HAUSP) con p53, llevando a degradación de p53 por el sistema ubiquitina-proteasoma. (Grywalska & Rolinski, 2015, p. 292)

EBNA-2 es una proteína nuclear, de las primeras que se expresan en linfocitos infectados. En conjunto con EBNA-LP promueve la transición de la fase celular G0 a la G1 en células B de reposo. Aumenta fuertemente la expresión de LMP-1 y LMP-2. Modula la activación transcripcional de diferentes marcadores de activación de células B (CD21, CD23, hes-1, runx3, MYC). (Dolcetti, 2015, p. 59)

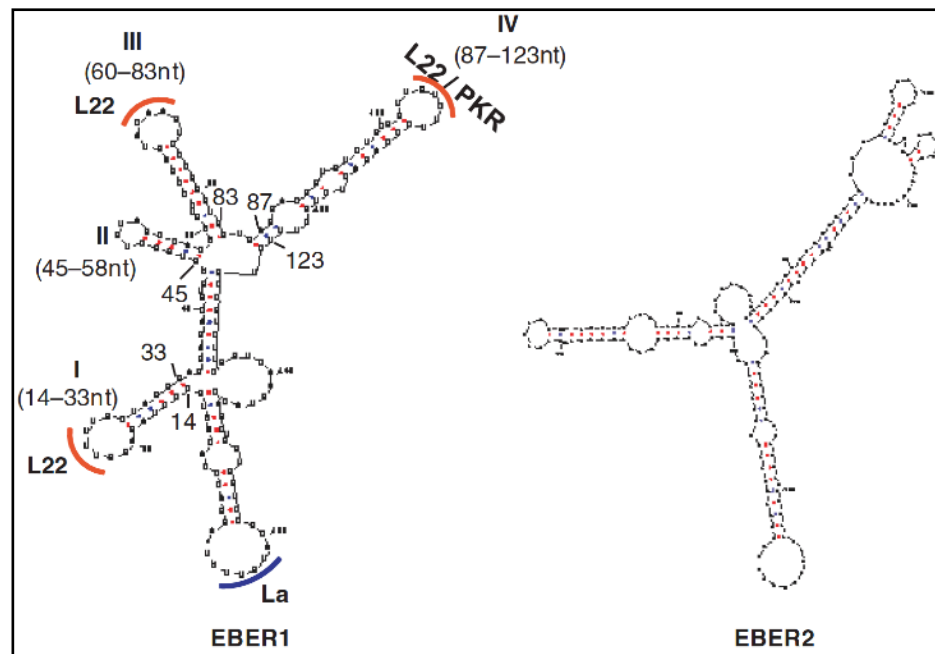
Los genes que codifican EBNA-3 (3A, 3B, 3C) son secuencias en tándem en el genoma viral. Las proteínas EBNA-3A y EBNA-3C son absolutamente necesarias para la transformación de células B. Ambas facilitan la proliferación celular por represión epigenética de expresión de la proteína pro-apoptótica Bim e inhibidores del ciclo celular. **(Ver Figura 3)** EBNA-3C no se requiere para

transformación de linfocitos B; sus funciones radican en aumento de la expresión celular de CD21 y MYC, aumento de la expresión de LMP-1 y reducción de la actividad del promotor Cp. (Elgui de Oliveira et al., 2016, p. 655)

La expresión de EBNA-LP (EBNA-5) es paralela a la expresión de EBNA-2 en linfocitos B naïve infectados. Es responsable de la co-activación de la actividad transcripcional de la proteína LMP-1, controlada por EBNA-2. (Grywalska & Rolinski, 2015, p. 295)

- **Ácidos ribonucleicos pequeños no codificantes (EBERs)**

EBERs son los transcriptos virales más abundantes en células infectadas con latencia del virus. Son ácidos ribonucleicos no-poliadenilados, no-codificantes, que se transcriben por la ARN polimerasa III (pol III). EBER-1 tiene una longitud de 167 nucleótidos y EBER-2 una longitud de 172 nucleótidos, comparten sólo 54% de homología en su secuencia. (Samanta & Takada, 2010, p. 30) Están separados por 161 pares de bases y se transcriben de izquierda a derecha, con regiones de control de transcripción intragénicas. Las secuencias primarias son altamente conservadas, lo que sugiere la importancia en el ciclo de vida del virus. (Iwakiri, 2016, p. 30)



**Figura 2. Estructura secundaria de EBERs y sus sitios potenciales de unión a proteínas.**

L22: proteína ribosomal, La: antígeno asociado a lupus eritematoso, PKR: proteína quinasa activada por ARN. (Samanta & Takada, 2010, p. 30).

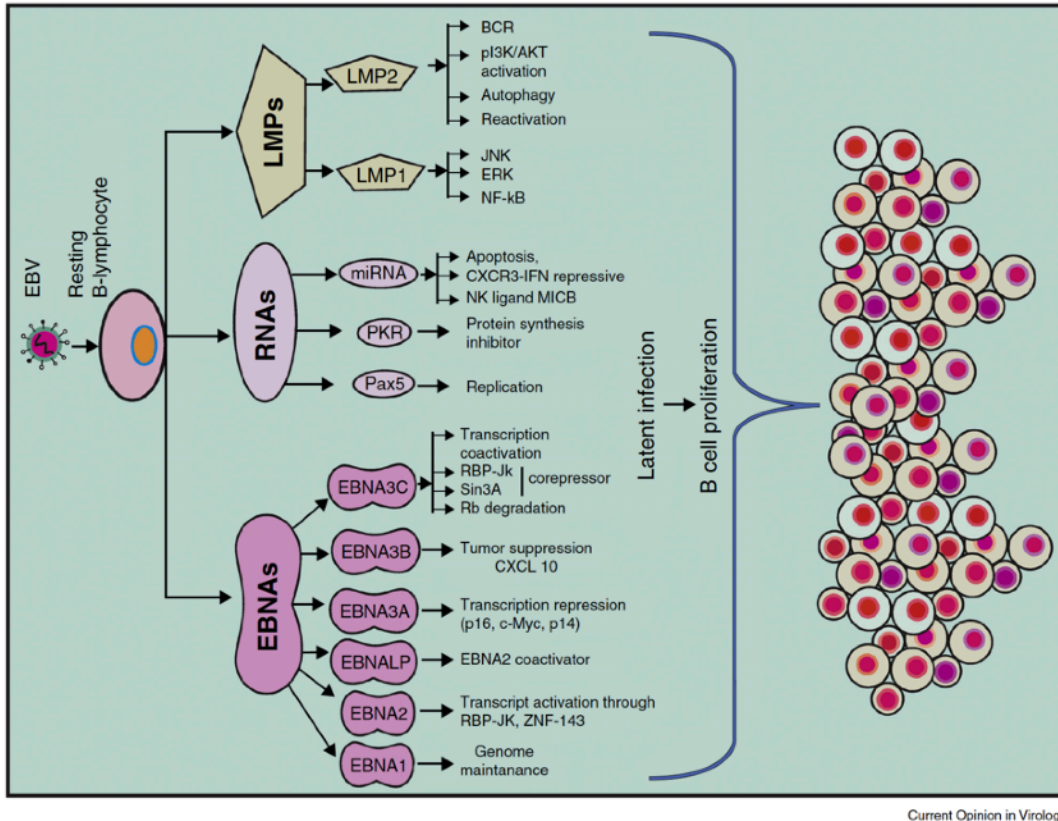
La conservación de su estructura secundaria es crítica para su funcionalidad. **(Ver figura 2)** Se ha demostrado que tienen un rol significativo en la oncogénesis mediada por VEB. EBER-1 muestra una expresión más fuerte que EBER-2, sin relación con el programa de latencia viral expresado. Estos ácidos ribonucleicos bloquean apoptosis, inducen la producción de interleucina 10 (IL-10) e inhiben la actividad anti-viral de los interferones (IFN) alfa y gamma. Se unen al gen inducible de ácido retinoico (RIG-I), activan su vía de señalización llevando a activación de interferones tipo I. Estimulan la síntesis de IL-10 por activación independiente de NF- $\kappa$ B. (Elgui de Oliveira et al., 2016, p. 659)

Otras funciones de los EBERs incluyen la inhibición de la fosforilación relacionada con PKR de EIF2a, lo cual conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas. **(Ver Figura 3)** Recientemente se ha demostrado que EBER2 se une al ARN naciente para regular la unión del factor de transcripción PAX5 a su sitio dentro de las repeticiones terminales del VEB. (Kempkes & Robertson, 2015, p. 142) Forman complejos con la proteína ribosomal L22, el antígeno asociado a lupus eritematoso (La) y con el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I). **(Ver Figura 2)** (Laing et al., 2002, p. 254)

- **microARNs**

Micromoléculas de ácido ribonucleico codificadas en áreas líticas del genoma viral (BHRF1) y en áreas latentes (BART); BHRF1 codificada 4 miARNs y BART codifica 40 miARNs. (Dong et al., 2019, p. 30) Su función se encuentra en investigación, pero su presencia en células B infectadas en muchos linfomas sugiere que pueden jugar un rol importante en su patogénesis. (Grywalska & Rolinski, 2015, p. 296)

Los BARTs miARNs se expresan en todas las células infectadas y en los diferentes patrones de latencia. (Forte & Luftig, 2011, p. 1157) Los BHRF1 miARNs son restringidos y se detectan principalmente en el programa de latencia III y durante la infección temprana. (Kempkes & Robertson, 2015, p. 142)



**Figura 3. Esquema de los componentes del ciclo de vida latente de VEB y su contribución en la transformación de linfocitos B**

El esquema muestra una visión integral de los muchos componentes del ciclo de vida latente del VEB que involucran las proteínas de membrana latente (LMPs) y los antígenos nucleares (EBNAs), así como los ARNs pequeños codificados por el VEB. La infección por VEB de linfocitos B en reposo conduce a la expresión del conjunto completo de transcripciones latentes. Las LMPs están involucradas en la disregulación de una serie de vías celulares importantes, incluidas JNK, PI3K y NF-κB, así como en la reactivación del virus. Los ARNs pequeños están involucrados en una serie de actividades diferentes que incluyen la replicación y apoptosis. Los EBNAs se dirigen a una amplia gama de procesos celulares desde la expresión génica, el mantenimiento del genoma, la supresión tumoral y la regulación del ciclo celular. Estas actividades contribuyen a la transformación de linfocitos B mediada por VEB de las células infectadas y sugieren que un conjunto coordinado de estas actividades es fundamental para impulsar las patologías vinculadas.

Tomado de (Kempkes & Robertson, 2015, p. 140).

## JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La realización del presente trabajo sirve para caracterizar la población de estudio de linfoma difuso de células B grandes sin otra especificación, así como para determinar la variante virus Epstein-Barr positiva mediante la implementación de hibridación *in situ* cromogénica. Esta variante se ha visto en la literatura que tiene un peor pronóstico, por lo que requiere un seguimiento estricto de estos pacientes.

La población de estudio es bastante representativa de la situación nacional, ya que abarca dos hospitales nacionales. Los hallazgos derivados del estudio pretenden orientar el diagnóstico oportuno y el tratamiento más conveniente según lo publicado en la literatura internacional. Esto porque en la actualidad no se cuenta con un reporte de la situación nacional de estas patologías.

La asociación estadística mediante la realización del modelo de regresión logística, de la variable EBER con las variables sociodemográficas, clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas pretende proyectar la positividad EBER, y de esta manera predecir la positividad para virus Epstein-Barr, haciendo un uso dirigido de esta costosa y limitada prueba.

Dado que a nivel nacional únicamente el Hospital San Juan de Dios realiza la prueba de hibridación *in situ* cromogénica para virus Epstein-Barr (EBER), resulta conveniente el presente estudio para justificar su utilización rutinaria en el diagnóstico del linfoma difuso de células B grandes. De esta manera, generar un precedente para la implementación en otros centros hospitalarios nacionales, que se encargan del diagnóstico y tratamiento de esta patología.

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Actualmente no se cuenta con un estudio nacional que caracterice el linfoma difuso de células B grandes y su variante virus Epstein-Barr positivo. Esto limita la extrapolación de datos sobre diagnóstico y tratamiento, desde estudios de la literatura internacional.

**PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es posible predecir la positividad para virus Epstein-Barr con hibridación *in situ* cromogénica (EBER) utilizando variables sociodemográficas, clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas?

**HIPÓTESIS NULA**

No es posible predecir la positividad para EBER mediante variables sociodemográficas, clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas.



## **DISEÑO DEL ESTUDIO**

### **1. PROPÓSITO DEL ESTUDIO**

#### **1.1. Características de la población de estudio**

Pacientes mayores de 50 años, de ambos sexos, diagnosticados con linfoma difuso de células grandes B, mediante biopsias realizadas en el periodo comprendido entre el 1 de enero del 2013 al 31 de diciembre de 2015, en los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios y del Hospital México.

#### **1.2. Número total de casos incluidos en el estudio**

Con base en la estadística reportada por la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios (HSJD), en el periodo comprendido entre el 1 de enero del 2013 y el 31 de diciembre del 2015, se diagnosticaron un total de 98 casos nuevos de linfoma difuso de células B grandes. En el Hospital México (HM) fueron 156 casos nuevos. Este estudio incluyó 77 casos del HSJD y 137 casos del HM, para un total de 214 casos totales enrolados. Se excluyeron 21 casos del HSJD y 19 casos del HM por falta de material o extravío del bloque de tejido en el archivo del hospital respectivo.

#### **1.3. Criterios de inclusión de los casos analizados**

- Rango de edad: pacientes mayores de 50 años diagnosticados con linfoma difuso de células B grandes, en el Hospital San Juan de Dios y en el Hospital México, en el periodo del 1 de enero del 2013 al 31 de diciembre del 2015.
- Género. No hubo discriminación de género, se incluyeron tanto hombres como mujeres
- Etnia. No aplica en este estudio
- Inclusión de clases especiales o participantes vulnerables. No aplica en este estudio.

#### **1.4. Criterios de exclusión de los casos analizados**

- Pacientes menores de 50 años. Debido a limitaciones de recursos económicos y logísticos para la realización del estudio, se incluyeron únicamente pacientes mayores de 50 años debido a su pobre supervivencia y mal pronóstico. De esta manera contribuir con el diagnóstico oportuno y la terapia dirigida en este grupo etario.

- Pacientes a los que no se les realizó estudio de inmunohistoquímica al momento del diagnóstico.

### **1.5. Objeto de estudio:**

Biopsias y reportes de biopsias de pacientes mayores de 50 años, de ambos sexos, diagnosticados con linfoma difuso de células B grandes, en el periodo comprendido entre el 1 de enero del 2013 al 31 de diciembre de 2015, en los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios y del Hospital México.

### **1.6. Resultados esperados del presente estudio**

Con base en la revisión bibliográfica que motivó la realización del presente estudio se esperaban obtener como resultados del estudio una asociación positiva entre la expresión de EBER y los hallazgos morfológicos sugestivos de infección por virus Epstein-Barr, los cuales corresponden a necrosis coagulativa geográfica, presencia de células tipo Hodgkin o tipo Reed-Sternberg, diferenciación plasmacítica, patrón angiocéntrico y fenotipo polimorfo.

Una mayor cantidad de casos con presentación extraganglionar, en sitios como tracto gastrointestinal, pulmón, amígdalas y piel. Una edad media de diagnóstico entre 66 y 71 años, con predominancia en hombres.

Con base en el algoritmo de Hans, se esperaba un mayor porcentaje de casos de linfoma tipo no centro germinal o activado, con expresión de MUM1/IRF4 y negatividad para BCL6 y CD10. En el inmunofenotipo se esperaba expresión de CD30 en las células tipo Hodgkin o tipo Reed-Sternberg y un índice de proliferación alto, dado por la expresión de Ki-67.

En relación con la hibridación *in situ* cromogénica, se esperaba obtener mayor eficiencia con este método para determinar la infección por virus Epstein-Barr, y menor eficiencia con la inmunohistoquímica para la proteína latente de membrana (LMP-1).

## **2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **2.1. Objetivo general**

- Establecer la posible asociación entre la morfología, el perfil de inmunohistoquímica y la expresión de los ácidos ribonucleicos tempranos codificados por el virus Epstein-Barr (EBER) en el linfoma difuso de células B grandes, en pacientes mayores de 50 años.

## 2.2.Objetivos específicos

- Documentar los hallazgos morfológicos sugestivos de infección por virus Epstein-Barr en biopsias diagnosticadas con linfoma difuso de células B grandes, en pacientes mayores de 50 años.
- Determinar la expresión inmunohistoquímica de CD10, BCL2, BCL6, MUM1/IRF4, CD30, Ki-67, MYC y LMP-1, para conocer el perfil de inmunohistoquímica del linfoma difuso de células B grandes, en pacientes mayores de 50 años.
- Evaluar la expresión por hibridación *in situ* cromogénica de los ácidos ribonucleicos tempranos codificados por el virus Epstein-Barr (EBER), para conocer la prevalencia de esta variante del linfoma difuso de células B grandes, en pacientes mayores de 50 años.
- Identificar las variables sociodemográficas, clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas que mejor contribuyen para detectar la infección por virus Epstein-Barr en el linfoma difuso de células B grandes, en pacientes mayores de 50 años.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1.Microscopia de luz: valoración de arquitectura y morfología celular

Se analizaron los parámetros morfológicos asociados en la literatura con la variante virus Epstein-Barr positivo, mediante observación de las biopsias bajo microscopia de luz.

#### 3.1.1.Necrosis:

- Porcentaje de la muestra que corresponde a tejido necrótico.

#### 3.1.2.Patrón angiocéntrico:

- Presencia de células tumorales en la pared de vasos sanguíneos intratumorales de mediano y gran calibre.

#### 3.1.3.Tipo de infiltrado:

- Polimorfo: las células neoplásicas presentan alta variación en tamaño y morfología, se acompañan de células inflamatorias (histiocitos, células plasmáticas, linfocitos maduros, eosinófilos, neutrófilos).

- Monomorfo: las células neoplásicas presentan leve variación en tamaño y morfología, dando una apariencia monótona. Hay pocas células inflamatorias acompañantes.

#### **3.1.4.Morfología plasmacítica:**

- Las células neoplásicas presentan núcleo excéntrico y moderado citoplasma eosinofílico, dando una apariencia plasmocitoide.

#### **3.1.5.Células similares a células de Hodgkin/Reed-Sternberg:**

- Hay células neoplásicas de gran tamaño, con nucléolo prominente y uninucleadas, binucleadas o multinucleadas.

### **3.2.Inmunohistoquímica:**

Este apartado describe los procedimientos para la realización de la inmunohistoquímica empleada en esta investigación, según protocolos del fabricante en el equipo BenchMark ULTRA. (Ventana Medical Systems, Inc., 2016)

#### **3.2.1.Desparafinar:**

- Sumergir los portaobjetos secuencialmente en 3 baños de xileno, durante 5 +/- 1 minuto cada vez.
- Transferir los portaobjetos a etanol al 100% y sumergirlos consecutivamente en 2 baños de esta solución, durante 3 +/- 1 minuto cada vez.
- Transferir los portaobjetos a etanol al 95% y sumergirlos en un baño de esta solución, durante 3 +/- 1 minuto cada vez.
- Transferir los portaobjetos a etanol al 80% y sumergirlos en un baño de esta solución, durante 3 +/- 1 minuto cada vez.
- Transferir los portaobjetos a un baño de agua desionizada o destilada y sumergirlos como mínimo 10 veces.
- Transferir los portaobjetos a la solución APK Wash (1X) o a una solución tampón. Para la solución APK Wash, los portaobjetos deben permanecer en esta solución hasta que se pueda realizar el proceso de tinción. Para la solución tampón, los portaobjetos deben permanecer en esta solución hasta que se pueda realizar el proceso de desmascaramiento del antígeno. No dejar que los portaobjetos se sequen.

### **3.2.2.Desenmascaramiento del antígeno:**

- Preparar la cámara para su uso.
- Colocar el recipiente en la cámara. Alinear las asas del recipiente con las asas de la cámara.
- Llenar el recipiente con 500 mL de agua desionizada y colocar el protector de calor (pantalla circular) en el centro del recipiente.
- Colocar cada placa de tinción, llenas con 250 mL de citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) o de tampón EDTA 1 mM (pH 8,0), y los portaobjetos apropiados en el protector de calor situado en el centro del recipiente. La solución Cell Conditioning 1 (pH 8,5) puede sustituir el tampón EDTA, y la solución Cell Conditioning 2 (pH 6,0) puede sustituir al citrato sódico, 10 mM.
- Poner la tapa de la cámara y cerrarla.
- Ajustar la temperatura hasta aproximadamente 120 °C.
- Poner en marcha la cámara y vigilar hasta que la presión alcance de 17 a 25 psi, y la temperatura sea de 120 - 125 °C. Una vez que alcance la temperatura deseada, cronometrar 2 minutos. Se debe controlar las condiciones de temperatura y de presión para confirmar que se cumplen las especificaciones deseadas.
- Retirar el envase con los portaobjetos del recipiente y colocar los soportes de portaobjetos en un envase con agua desionizada a temperatura ambiente.
- Etiquetar los portaobjetos y cambiar el agua desionizada por APK Wash (1X).

### **3.2.3.Tinción:**

- Poner el anticuerpo primario e incubar durante 16 min. (**Ver Cuadro 3**)
- Aplicar una gota de hematoxilina e incubar durante 4 min.
- Aplicar una gota de BLUING REAGENT (bicarbonato de sodio o carbonato de litio) e incubar durante 4 min.
- Realizar dos lavados con agua jabonosa.
- Realizar un lavado con agua durante 2 minutos.
- Secuencia de deshidratación (2 min en cada solución): alcoholes de 95° - 95° - 100° - 100°.
- Secuencia de aclaramiento: 2 min en cada solución de xilol.
- Montar el cubreobjetos.

**Cuadro 3. Anticuerpos utilizados para la tinción de inmunohistoquímica, según clonas y diluciones utilizadas.**

Anticuerpo	Clona	Dilución
CD20	L26, primario monoclonal de ratón	1:100-1:500
BCL2	SP66, primario monoclonal de conejo	1:100-1:200
BCL6	GI191E/A8, primario monoclonal de ratón	1:100-1:500
MUM1/IRF4	MRQ-43, primario monoclonal de conejo	1:100-1:500
CD10	SP67, primario monoclonal de conejo	1:10-1:50
LMP-1	CS1-4, primario monoclonal de ratón	1:100-1:200
Ki-67	30-9, primario monoclonal de conejo	1:75-1:150
CD30	Ber-H2, primario monoclonal de ratón	1:20-1:40
MYC	Y69, primario monoclonal de conejo	1:25-1:100

**Fuente:** Protocolos de anticuerpos (Ventana Medical Systems, Inc., 2016)

### **3.3.Hibridación *in situ* cromogénica (CIHS):**

A continuación se describe el procedimiento de hibridación *in situ* cromogénica empleado en esta investigación, según protocolo del fabricante en el equipo BenchMark GX. (Ventana Medical Systems, Inc., 2017)

#### **3.3.1.Desparafinar:**

- Realizar dos lavados en xileno durante 3 minutos cada uno.
- Realizar un lavado en solución 1:1 de xileno y etanol 100° durante 3 minutos.
- Realizar lavados de 3 minutos cada uno en la siguiente secuencia de alcoholes: 100° - 100° - 95° - 70° - 50°.
- Lavar con agua fría.
- Hacer un calentamiento del portaobjetos a 72 °C e incubar durante 4 min.
- Aplicar solución EZPrep 10X, ajustar volumen y enjuagar el portaobjetos con la misma solución.
- Aplicar solución EZPrep 10X, ajustar volumen y enjuagar el portaobjetos con la misma solución.
- Aplicar desparafinador , ajustar volumen.

- Habilitar mezcladores.
- Anular el calentador de portaobjetos.
- Enjuagar el portaobjetos con solución EZPrep 10X.

### **3.3.2.Desenmascaramiento del antígeno:**

- Hacer un calentamiento del portaobjetos a 36 °C.
- Aplicar 450 uL de solución EZPrep 10X.
- Aplicar el acondicionador celular n°2.
- Calentar el portaobjetos a 86 °C e incubar durante 4 minutos.
- Aplicar el acondicionador celular n°2 e incubar durante 8 minutos.
- Anular el calentador e incubar durante 4 minutos.
- Enjuagar con solución Reaction buffer.
- Aplicar 450 uL de tampón de reacción.
- Hacer un calentamiento del portaobjetos a 36 °C.
- Aplicar una gota de ISH-proteasa 3 e incubar durante 4 minutos.
- Enjuagar con solución Reaction buffer.
- Realizar dos lavados con solución SCC.
- Calentar el portaobjetos a 50 °C e incubar durante 4 minutos.
- Aplicar 150 uL de solución SSC.

### **3.3.3.Tinción:**

- Aplicar una gota de Inform EBER e incubar durante 4 minutos.
- Calentar el portaobjetos a 82 °C e incubar durante 8 minutos.
- Calentar el portaobjetos a 55 °C e incubar durante 8 minutos.
- Realizar dos lavados con solución SCC.
- Aplicar 450 uL de solución SSC e incubar durante 8 minutos. Repetir 3 veces.
- Anular el calentador de portaobjetos.
- Enjuagar con solución Reaction Buffer.
- Calentar el portaobjetos a 36 °C.
- Enjuagar con solución Reaction Buffer.
- Aplicar una gota de iVIEW ANTI-FLUOR e incubar durante 20 minutos.
- Realizar dos lavados con solución Reaction Buffer.
- Aplicar una gota iVIEW BLUE BIOT e incubar durante 8 minutos.

- Realizar dos lavados con solución Reaction Buffer.
- Aplicar una gota iVIEW BLUE SA-AP e incubar durante 16 minutos.
- Realizar dos lavados con solución Reaction Buffer.
- Aplicar una gota iVIEW BLUE ENHAN e incubar durante 4 minutos.
- Aplicar una gota iVIEW BLUE NBT + una gota de iVIEW BLUE BCIP e incubar durante 32 minutos.
- Realizar dos lavados con solución Reaction Buffer.
- Aplicar una gota de Red Stain II e incubar durante 4 minutos.
- Realizar dos lavados con solución Reaction Buffer.
- Anular el calentador de portaobjetos.
- Realizar un lavado con solución Reaction Buffer.
- Realizar dos lavados con agua jabonosa.
- Realizar un lavado con agua durante 2 minutos.
- Secuencia de deshidratación (2 min en cada solución): alcoholes de 95° - 95° - 100° - 100°.
- Secuencia de aclaramiento: 2 min en cada solución de xilol.
- Montar el cubreobjetos.

#### **3.3.4. Controles:**

- Positivo: caso de linfoma de Hodgkin clásico conocido EBER positivo
- Negativo: ganglio linfático sin alteraciones histológicas conocido EBER negativo

#### **3.3.5. Positividad para EBER:**

- Porcentaje mayor a 20% de células neoplásicas con expresión nuclear EBER

## **4. DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS APLICADOS A SERES HUMANOS**

### **4.1. Almacenaje de los datos y confidencialidad**

Se utilizó un sistema de codificación en la hoja de extracción de datos que sólo conoció el investigador principal y los tutores, esta hoja no contó con datos personales que pudieran identificar al paciente.



#### **4.2. Manejo de tejidos y muestras biológicas**

Se utilizaron los bloques de parafina almacenados en el archivo del Servicio de Patología de cada centro hospitalario, correspondientes a los casos en estudio. Posterior a la realización de las pruebas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* cromogénica, estos fueron devueltos al archivo para continuar con el almacenamiento según el tiempo correspondiente. El estudio tuvo el aval del Comité Ético Científico Institucional, del Centro de Desarrollo Estratégico e Información en Salud y Seguridad Social, de la Caja Costarricense del Seguro Social, aprobado en la sesión 012-07-2017 y con el número de protocolo R017-SABI-00125.

### **5. EVALUACIÓN DEL RIESGO/BENEFICIO DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **5.1. Riesgos potenciales**

Los riesgos potenciales derivados de la investigación fueron mínimos asociados a pérdida de la confidencialidad, ya que únicamente se analizaron los reportes de las biopsias y bloques de tejido parafinado correspondientes. A fin de proteger la identidad del paciente se utilizó un sistema de codificación en la hoja de extracción de datos que sólo conocieron el investigador principal y los tutores, esta hoja no contó con datos personales que pudieran identificar al paciente por lo que se minimizó el riesgo.

#### **5.2. Clasificación de riesgo**

Riesgo mínimo por pérdida de la confidencialidad.

#### **5.3. Parámetros de seguridad y eficacia**

Se utilizó la hoja de recolección de datos como parámetro de seguridad para garantizar la confidencialidad, ya que esta no contó con datos personales que pudieran identificar al paciente.

#### **5.4. Potenciales beneficios para el participante y para la sociedad**

Generar un marco de conocimiento sobre las características morfológicas y el perfil de inmunohistoquímica del linfoma difuso de células B grandes EBER positivo en Costa Rica, de lo cual no hay ningún estudio reportado a la fecha. Esto dará pie a nuevos estudios que beneficien futuros pacientes con este diagnóstico, y valorar el uso de medidas diagnósticas y terapéuticas específicas para cada caso.

Al conocer la asociación de la infección del virus Epstein-Barr con el linfoma difuso de células B grandes en este país, se fomentarán estudios posteriores para valorar su participación en la génesis de este linfoma.

Al identificar la incidencia del compromiso de la médula ósea por el linfoma difuso de células B grandes, se contribuye a la toma de medidas diagnósticas y terapéuticas con mayor impacto en este sentido.

Al corroborar mayor eficiencia de la prueba de hibridación *in situ* cromogénica para determinar la infección por el virus Epstein-Barr, se justificará la implementación rutinaria de este método en el diagnóstico del linfoma difuso de células B grandes. No existe beneficio directo para el participante.

#### **5.5. Balance del riesgo / beneficio**

El riesgo fue mínimo y correspondió a la pérdida de confidencialidad, lo cual se minimizó mediante la implementación del sistema de codificación en la hoja de extracción de datos que sólo conocieron el investigador principal y los tutores.

El beneficio fue generar un marco de conocimiento sobre las características morfológicas y el perfil de inmunohistoquímica del linfoma difuso de células B grandes y su asociación con la expresión de EBER, de lo cual no hay estudios en Costa Rica. No existe beneficio directo para el participante.

De lo anterior se deduce que el beneficio fue mayor para la sociedad. Esto debido a que se caracterizó la morfología y el perfil de inmunohistoquímica del linfoma difuso de células B grandes EBER positivo, con lo cual se podrán realizar nuevos estudios sobre innovadoras opciones terapéuticas, que se han asociado con mayor supervivencia y mejor calidad de vida.

En cuanto al riesgo, este fue mínimo y se asoció con pérdida de la confidencialidad, y se minimizó mediante la implementación de la hoja de extracción de datos, la cual no contó con datos personales del paciente.

#### **5.6. Eventos adversos**

No aplica en este estudio, ya que no se administró ningún medicamento a los pacientes.

## **6. CONSIDERACIONES ESTADÍSTICAS**

### **6.1. Variables del estudio**

**Cuadro 4. Variables categóricas y numéricas valoradas en este estudio.**

VARIABLES			
CATEGÓRICA (CUALITATIVA)		NUMÉRICA (CUANTITATIVA)	
NOMINAL	ORDINAL	DISCRETA	CONTINUA
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sexo</li> <li>- CD10</li> <li>- BCL2</li> <li>- BCL6</li> <li>- MUM1/IRF4</li> <li>- CD30</li> <li>- LMP-1</li> <li>- Subgrupo de origen</li> <li>- Compromiso de la médula ósea</li> <li>- Patrón angiocéntrico/angioinvasión</li> <li>- Tipo de infiltrado</li> <li>- Diferenciación plasmacítica</li> <li>- Células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg</li> <li>- Sitio anatómico de toma de la biopsia</li> </ul>	- Ninguna	- Ninguna	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Edad</li> <li>- Porcentaje de expresión de Ki-67</li> <li>- Porcentaje de expresión de EBER</li> <li>- Porcentaje de expresión de MYC</li> <li>- Porcentaje de necrosis geográfica</li> </ul>

## 6.2. Método para el análisis de datos.

La expresión de EBER se consideró la variable más importante, puesto que esta es la que se modeló para estimar la probabilidad de que un caso sea EBER positivo a partir de las variables morfológicas e inmunohistoquímicas, controlando por sexo y edad.

Para esto se desarrolló un modelo de regresión logística tomando como respuesta la expresión de EBER.

Se utilizó la prueba de razón de verosimilitud (LRT siglas en inglés) para determinar cuáles variables morfológicas e inmunohistoquímicas dan un aporte significativo a la clasificación de casos. Se hizo una tabla de clasificación que compara la expresión observada del EBER contra la predicción según el modelo.

El modelo logístico se expresa de la siguiente forma:

$$\ln\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_p x_p$$

Donde  $x_1, x_2, \dots, x_p$  son los valores que cada caso presenta en las variables morfológicas e inmunohistoquímicas.

## 6.3. Cálculo del tamaño muestral

Se trabajó con todos los casos diagnosticados en el periodo de estudio.

#### **6.4. Mediciones y estimaciones**

El procesamiento de la información se realizó con el Software R versión 4.0.1

### **7. IDENTIFICACIÓN DE PARTICIPANTES, RECLUTAMIENTO Y CONSENTIMIENTO**

#### **7.1. Método de identificación y reclutamiento**

Mediante delimitación por palabra clave (linfoma difuso de células B grandes) y periodo de estudio (1 de enero de 2013 al 31 de diciembre de 2015) se extrajo de las bases de datos los resultados de biopsias positivas por linfoma difuso de células B grandes, con estudio de inmunohistoquímica, en la base de datos de los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales San Juan de Dios y México, del 1 de enero de 2013 al 31 de diciembre de 2015.

El reclutamiento de pacientes no aplicó en esta investigación al tratarse de un estudio retrospectivo.

#### **7.2. Excepciones para obtener el consentimiento informado**

Se presentó carta de solicitud de excepción para la obtención de un consentimiento debidamente firmado.

### **8. CONTROL DE CALIDAD**

#### **8.1. Mecanismos para garantizar la integridad y veracidad de datos**

La Dra. Rosario Espinoza Mora, tutora académica del Hospital Calderón Guardia, la Dra. Mónica Araya Rojas, tutora institucional del Hospital San Juan de Dios y el Comité Ético Científico Institucional (CECI) velaron por la veracidad de los datos.

#### **8.2. Entes autorizados para realizar monitoreos y auditorías**

El Comité Ético Científico Institucional (CECI) estuvo autorizado para realizar monitoreos y auditorías.

### **9. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS**

#### **9.1. Principio de autonomía**

El principio de autonomía se basó en el fundamento de que el sujeto tiene la capacidad de darse a sí mismo su actuar como persona, es decir, determinar su propia norma. En forma autónoma tiene la libertad de elegir, aplicando su propio razonamiento y -de acuerdo al análisis de los aspectos positivos y negativos- determinar cuál será su conducta frente a una de-

terminada situación, puesto que el presente estudio posee un diseño descriptivo se prescindió de consentimiento informado que sería el único contacto entre el participante y el equipo investigador.

### **9.2.Principio de justicia**

El principio de justicia se basó en tratar a cada uno como corresponda, con la finalidad de disminuir las situaciones de desigualdad ideológica, social, cultural, económica o de cualquier otro índole. En el presente estudio se respetó el principio de justicia ya que todo paciente diagnosticado con linfoma difuso de células B grandes fue incluido en el estudio, no hubo discriminación de ningún tipo.

### **9.3.Principio de beneficencia**

El principio de beneficencia se basó en la obligación de actuar en beneficio de otros, promoviendo sus legítimos intereses y suprimiendo prejuicios. En este estudio se respetó el principio de beneficencia ya que la información obtenida de las biopsias se utilizó en beneficio de los pacientes en aras de mejorar el manejo clínico.

### **9.4.Principio de no maleficencia**

El principio de no maleficencia implicó abstenerse intencionadamente de realizar acciones que puedan causar daño o perjudicar a otros. Las implicaciones médicas del principio de no maleficencia incluyen tener una formación teórica y práctica, rigurosa y actualizada permanentemente, para dedicarse al ejercicio profesional; e investigar sobre tratamientos, procedimientos o terapias nuevas, para mejorar los ya existentes con objeto de que sean menos dolorosos y lesivos para los pacientes. El presente estudio respetó el principio de no maleficencia ya que el equipo de investigadores posee una formación académica y profesional adecuada, lo cual les permitió investigar sobre el tema con el objeto de mejorar el manejo de los pacientes. Además, los riesgos derivados de la investigación fueron mínimos, ya que sólo se valoraron los reportes de biopsias de los pacientes diagnosticados con linfoma difuso de células B grandes.

## RESULTADOS

Este apartado se subdivide en los resultados agrupados por tipos de variables para la población de linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, la cual corresponde a 214 casos; y posteriormente a la descripción de la subpoblación de linfoma difuso de células B grandes EBER positivo, la cual corresponde a 10 casos.

### LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES, SIN OTRA ESPECIFICACIÓN

Se analizaron 214 casos de linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, en pacientes mayores de 50 años. Estos casos provienen de dos hospitales nacionales: 156 casos del Hospital México y 98 casos del Hospital San Juan de Dios.

#### • Variables sociodemográficas

La edad media al diagnóstico de los pacientes estudiados fue de 67 años, en un rango de 50 a 96 años. La proporción de hombres/mujeres fue de 1:1, con 107 casos para cada sexo. El lugar de residencia de los pacientes fue desconocido en 44,8% de los casos. La distribución según el origen geográfico de los paciente fue 30,4% de la provincia de San José, 9,3% de la provincia de Alajuela, 3,3% de la provincia de Heredia y 0,5% de la provincia de Cartago, representando 43,5% de casos provenientes del Gran Área Metropolitana. De las provincias costeras, 6,5% fueron de Puntarenas, 4,7% de Guanacaste y 0,5% de Limón. (**Ver tabla 1**).

**Tabla 1.**

*Frecuencia absoluta y porcentual según sexo y lugar de residencia de los pacientes con linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación*

Características	Frecuencia absoluta	Frecuencia porcentual
<b>Total</b>	<b>214</b>	<b>100%</b>
<b>Sexo</b>		
Femenino	107	50,0%
Masculino	107	50,0%

Lugar de residencia, provincia		
San José	65	30,4%
Alajuela	20	9,3%
Heredia	7	3,3%
Cartago	1	0,5%
Puntarenas	14	6,5%
Guanacaste	10	4,7%
Limón	1	0,5%
No disponible	96	44,8%

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

#### • Variables clínicas

El linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, presentó infiltración a médula ósea en 7,9% de los casos y en 57,9% de los casos la médula ósea fue negativa. Un caso mostró infiltración por leucemia linfocítica crónica, representado 0,5% de los casos totales. En 1% de los casos la muestra fue insuficiente para realizar el diagnóstico de infiltración. En 32,7% de los casos no se documentó toma de muestra en las bases de datos. (Ver tabla 2).

**Tabla 2.**

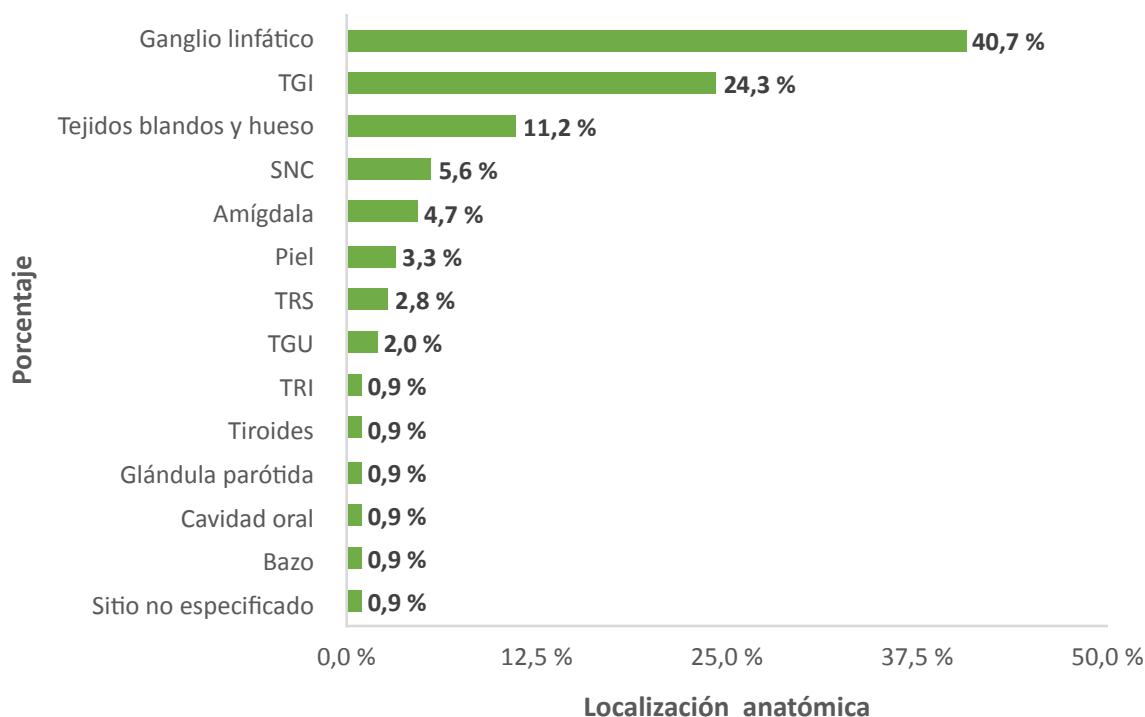
*Frecuencia absoluta y porcentual de la variable clínica infiltración de médula ósea por el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación*

Infiltración de médula ósea	Frecuencia absoluta	Frecuencia porcentual
<b>Total</b>	<b>214</b>	<b>100%</b>
Positivo	17	7,9%
Negativo	124	57,9%
LLC	1	0,5%
Insuficiente	2	1,0%
No disponible	70	32,7%

\*LLC: leucemia linfocítica crónica

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

Según la localización anatómica, 40,7% de los casos fueron ganglionares y 59,3% extraganglionares. Siendo el tracto gastrointestinal (24,3%), tejidos blandos y hueso (11,2%), sistema nervioso central (5,6%) y amígdala (4,7%) las cuatro principales localizaciones extraganglionares. (Ver figura 4).



**Figura 4. Distribución porcentual según localización anatómica del linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación**

\*TGI: tracto gastrointestinal, SNC: sistema nervioso central, TRS: tracto respiratorio superior, TGU: tracto genitourinario, TRI: tracto respiratorio inferior.

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

#### • Variables morfológicas

En el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, 43,9% de los casos presentó angioinvasión, en 56,5% de los casos el tipo de infiltrado fue polimórfico, 8,4% de los casos mostraron diferenciación plasmacítica, en 48,6% de los casos se observaron células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg y 23,4% de los casos tenían necrosis geográfica, con 28,9% en promedio de extensión. (Ver tabla 3).



**Tabla 3.**

*Frecuencia absoluta y porcentual según variables morfológicas en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación*

<b>Características</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>Frecuencia porcentual</b>
<b>Total</b>	<b>214</b>	<b>100%</b>
<b>Angioinvasión</b>		
Negativo	120	56,1%
Positivo	94	43,9%
<b>Tipo de infiltrado</b>		
Monomórfico	93	43,5%
Polimórfico	121	56,5%
<b>Diferenciación plasmacítica</b>		
No	196	91,6%
Si	18	8,4%
<b>Células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg</b>		
No	110	51,4%
Sí	104	48,6%
<b>Necrosis geográfica</b>		
Ausente	164	76,6%
Presente	50	23,4%

Nota: Cuando hay presencia de necrosis geográfica, el promedio es de 28,9% de extensión.

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

#### • Variables inmunohistoquímicas

La población en estudio presentó positividad para CD10 en 43,5% de los casos, positividad para BCL6 en 87,9% de los casos y expresión de MUM1/IRF4 en 65% de los casos. El subgrupo de origen del linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, según aplicación del al-

goritmo de Hans, correspondió a centro germinal en 55,1% de los casos y a no centro germinal o activado en 44,9% de los casos. (Ver tabla 4).

**Tabla 4.**

*Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de variables inmunohistoquímicas (BCL6, MUM1/IRF4, CD10) y subgrupo de origen, en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación*

Variables inmunohistoquímicas	Frecuencia absoluta	Frecuencia porcentual
<b>Total</b>	<b>214</b>	<b>100%</b>
<b>BCL6</b>		
Negativo	26	12,1%
Positivo	188	87,9%
<b>MUM1/IRF4</b>		
Negativo	75	35,0%
Positivo	139	65,0%
<b>CD10</b>		
Negativo	121	56,5%
Positivo	93	43,5%
<b>Subgrupo de origen: algoritmo de Hans</b>		
GCB	118	55,1%
No GCB	96	44,9%

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

El análisis de inmunohistoquímica del linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, presentó 98,6% de expresión de CD20, 83,2% de expresión de BCL2, 4,2% de expresión de LMP-1, 69,6% de expresión de MYC y 15,9% de expresión de CD30. (Ver tabla 5). El índice de proliferación celular dado por la expresión de Ki-67 fue de 80% en promedio.

**Tabla 5.**

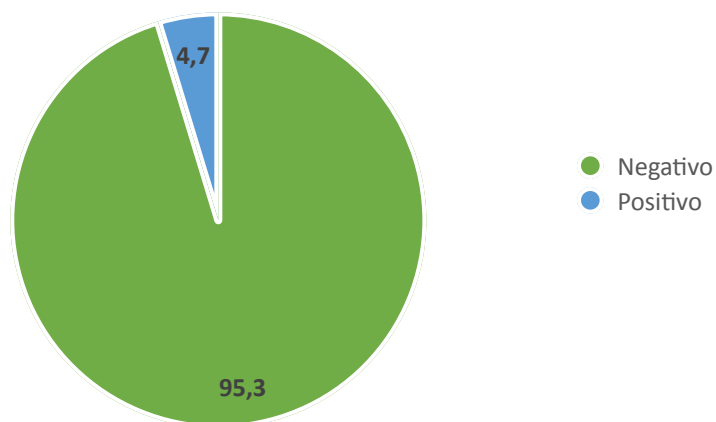
*Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de variables inmunohistoquímicas en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación*

<b>Variables inmunohistoquímicas</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>Frecuencia porcentual</b>
<b>Total</b>	<b>214</b>	<b>100%</b>
<b>CD20</b>		
Negativo	3	1,4%
Positivo	211	98,6%
<b>BCL2</b>		
Negativo	36	16,8%
Positivo	178	83,2%
<b>LMP-1</b>		
Negativo	205	95,8%
Positivo	9	4,2%
<b>MYC</b>		
Negativo	65	30,4%
Positivo	149	69,6%
<b>CD30</b>		
Negativo	180	84,1%
Positivo	34	15,9%

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

- **Expresión de EBER por hibridación *in situ* cromogénica**

El linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, presentó expresión de virus Epstein-Barr (EBER) por hibridación *in situ* cromogénica (CISH) en 4,7% de los casos. **(Ver figura 5).**



**Figura 5. Distribución porcentual según la expresión de EBER por hibridación *in situ* cromogénica (CISH) en el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación**

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

## LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES, EBER POSITIVO

La población de estudio mostró positividad para EBER con hibridación *in situ* cromogénica en 10 casos, lo cual representa 4,7% de los casos totales y corresponden a la subpoblación de linfoma difuso de células B grandes, EBER positivo.

Esta subpoblación mostró una edad media al diagnóstico de 69 años, en un rango de 55 a 72 años. La proporción de hombres/mujeres fue de 2,3:1. (**Ver tabla 6**). El lugar de residencia de los pacientes fue desconocido en 6 de los casos; en los otros 4 casos se documentó un caso de la provincia de San José, un caso de la provincia de Alajuela, un caso de la provincia de Puntarenas y un caso de la provincia de Guanacaste.

En el análisis morfológico de los casos de linfoma difuso de células B grandes, EBER positivo, 50% de los casos presentó angioinvasión, en 70% el tipo de infiltrado fue polimórfico, 30% mostró diferenciación plasmacítica, en 50% se observaron células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg y 20% tenía necrosis geográfica, con 15% en promedio de extensión. (**Ver tabla 6**).

Según la localización anatómica, 40% de los casos fueron de ganglionares y 60% extraganglionares. Siendo el tracto gastrointestinal (20%), la piel (10%), la amígdala (10%) y la glándula parótida (10%) las localizaciones extraganglionares afectadas. (**Ver tabla 6**).

El linfoma difuso de células B grandes, EBER positivo, presentó infiltración a médula ósea en 10% de los casos y en 50% de los casos la médula ósea fue negativa. En 40% de los casos no se documentó toma de muestra en las bases de datos. (**Ver tabla 6**).

**Tabla 6.**

Casos con expresión de EBER por hibridación in situ cromogénica (CISH) en el linfoma difuso de células B grandes: variables sociodemográficas, morfológicas y clínicas

Caso	Edad	Sexo	Angioninvasión	Tipo de infiltrado	Diferenciación plasmacítica	Células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg	Necrosis geográfica	Localización anatómica	Infiltración de médula ósea
1	70	M	Negativo	Polimórfico	No	No	0%	TGI	Negativo
2	72	F	Negativo	Polimórfico	No	Si	10%	Glándula parótida	Negativo
3	73	F	Positivo	Polimórfico	No	Si	0%	Amígdala	Negativo
4	69	M	Positivo	Monomórfico	No	No	0%	Piel	Negativo
5	55	M	Positivo	Monomórfico	No	No	0%	Ganglio linfático	Negativo
6	75	M	Negativo	Polimórfico	Si	Si	0%	Ganglio linfático	No disponible
7	80	F	Negativo	Monomórfico	Si	No	0%	TGI	No disponible
8	56	M	Positivo	Polimórfico	Si	Si	20%	Cavidad oral	No disponible
9	65	M	Negativo	Polimórfico	No	No	0%	Ganglio linfático	Positivo
10	74	M	Positivo	Polimórfico	No	Si	0%	Ganglio linfático	No disponible

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

El porcentaje de expresión de ácidos ribonucleicos tempranos del virus Epstein-Barr (EBER) por hibridación *in situ* cromogénica en el linfoma difuso de células B grandes fue en promedio 53% (34,01 desviación estándar). El análisis de inmunohistoquímica de esta subpoblación, presentó 100% de expresión de CD20, 60% de expresión de BCL2, 30% de expresión de LMP-1, 70% de expresión de MYC y 50% de expresión de CD30. (**Ver tabla 7**). El índice de proliferación celular dado por la expresión de Ki-67 fue de 85,2% en promedio.

La subpoblación en estudio no presentó positividad para CD10. Se observó positividad para BCL6 en 80% de los casos y expresión de MUM1/IRF4 en 70% de los casos. (**Ver tabla 7**).

El subgrupo de origen del linfoma difuso de células B grandes, EBER positivo, según aplicación del algoritmo de Hans, correspondió a centro germinal en 30% de los casos y a no centro germinal o activado en 70% de los casos. (**Ver tabla 7**).

**Tabla 7.**

*Casos con expresión de EBER por hibridación in situ cromogénica (CISH) en el linfoma difuso de células B grandes: variables inmunohistoquímicas.*

Caso	EBER	CD20	BCL2	LMP-1	Ki-67	CD30	MYC	CD10	BCL6	MUM1/ IRF4	Subgrupo de origen
1	90%	Positivo	Negativo	Negativo	90%	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	GCB
2	90%	Positivo	Positivo	Positivo	80%	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	No GCB
3	20%	Positivo	Negativo	Positivo	80%	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	No GCB
4	90%	Positivo	Negativo	Negativo	90%	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	GCB
5	60%	Positivo	Positivo	Negativo	97%	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	GCB
6	20%	Positivo	Positivo	Positivo	80%	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	No GCB
7	20%	Positivo	Positivo	Negativo	80%	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No GCB
8	90%	Positivo	Negativo	Negativo	80%	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	No GCB
9	20%	Positivo	Positivo	Negativo	95%	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	No GCB
10	30%	Positivo	Positivo	Negativo	80%	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	No GCB

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.



## COMPARACIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO SEGÚN EXPRESIÓN DE EBER

A continuación se describen los resultados para las variables en estudio según expresión de EBER, en la población de linfoma difuso de células B grandes. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar la significancia estadística en los casos donde corresponde.

### • Variables sociodemográficas

La **tabla 8** describe la frecuencia absoluta y la frecuencia porcentual de las variables sociodemográficas: sexo y lugar de residencia, de la población en estudio de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER. No se encontró diferencia significativa para la variable sexo con una  $p$  de 0,33. En la variable lugar de residencia, no se aplicó prueba exacta de Fisher porque hay un 44,8% de datos no disponibles.

**Tabla 8.**

*Frecuencias absoluta y porcentual de las variables sociodemográficas sexo y lugar de residencia, en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER*

Características sociodemográficas	Expresión de EBER						p
	Frecuencia absoluta			Frecuencia porcentual			
	Negativo	Positivo	Subtotal	Negativo	Positivo	Subtotal	
Total	204	10	214	100,0%	100,0%	100,0%	
Sexo							
Femenino	104	3	107	51,0%	30,0%	50,0%	
Masculino	100	7	107	49,0%	70,0%	50,0%	0,33
Lugar de residencia							
Alajuela	19	1	20	9,3%	10,0%	9,3%	
Cartago	1		1	0,5%	0,0%	0,5%	
Guanacaste	9	1	10	4,4%	10,0%	4,7%	
Heredia	7		7	3,4%	0,0%	3,3%	
Limón	1		1	0,5%	0,0%	0,5%	
Puntarenas	13	1	14	6,4%	10,0%	6,5%	
San José	64	1	65	31,4%	10,0%	30,4%	
No disponible	90	6	96	44,1%	60,0%	44,8%	

p: probabilidad asociada, según prueba exacta de Fisher.

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

• Variables clínicas

La **tabla 9** describe la frecuencia absoluta y la frecuencia porcentual de la variable clínica infiltración de médula ósea, de la población en estudio de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER. No se aplicó prueba exacta de Fisher para determinar significancia estadística porque el porcentaje de datos no disponibles es muy alto.

**Tabla 9.**

*Frecuencia absoluta y porcentual de la variable clínica infiltración de médula ósea por el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER.*

Infiltración de médula ósea	Expresión de EBER					
	Frecuencia absoluta			Frecuencia porcentual		
	Negativo	Positivo	Subtotal	Negativo	Positivo	Subtotal
<b>Total</b>	<b>204</b>	<b>10</b>	<b>214</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>
Insuficiente	2		2	1,0%	0,0%	1,0%
LLC	1		1	0,5%	0,0%	0,5%
No disponible	66	4	70	32,4%	40,0%	32,7%
Negativo	119	5	124	58,3%	50,0%	57,9%
Positivo	16	1	17	7,8%	10,0%	7,9%

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

La **tabla 10** describe la frecuencia absoluta y la frecuencia porcentual de la variable clínica localización anatómica, de la población en estudio de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER. No se encontró diferencia significativa para la variable localización anatómica con una p de 0,62.

**Tabla 10.**

*Frecuencia absoluta y porcentual de la localización anatómica en linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER*

Localización anatómica	Expresión de EBER						p
	Frecuencia absoluta			Frecuencia porcentual			
	Negativo	Positivo	Subtotal	Negativo	Positivo	Subtotal	
Total	204	10	214	100,0%	100,0%	100,0%	
Extraganglionar	121	6	127	59,3%	60,0%	59,3%	
Ganglionar	83	4	87	40,7%	40,0%	40,7%	0,62

p: probabilidad asociada, según prueba exacta de Fisher

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

#### • Variables morfológicas

La **tabla 11** describe la la frecuencia absoluta y la frecuencia porcentual de las variables morfológicas: angioinvasión, tipo de infiltrado, diferenciación plasmacítica, células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg y necrosis geográfica, de la población en estudio de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER. Únicamente se encontró diferencia significativa para la variable diferenciación plasmacítica con una p de 0,04.

**Tabla 11.**

*Frecuencia absoluta y porcentual de variables morfológicas en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER*

Variables morfológicas	Expresión de EBER						p
	Frecuencia absoluta			Frecuencia porcentual			
	Negativo	Positivo	Subtotal	Negativo	Positivo	Subtotal	
Total	204	10	214	100,0%	100,0%	100,0%	
Angioinvasión							
Negativo	115	5	120	56,4%	50,0%	56,1%	
Positivo	89	5	94	43,6%	50,0%	43,9%	0,75
Tipo de infiltrado							
Monomórfico	90	3	93	44,1%	30,0%	43,5%	
Polimórfico	114	7	121	55,9%	70,0%	56,5%	0,52
Diferenciación plasmacítica							
No	189	7	196	92,6%	70,0%	91,6%	
Si	15	3	18	7,4%	30,0%	8,4%	0,04*
Células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg							
No	105	5	110	51,5%	50,0%	51,4%	
Si	99	5	104	48,5%	50,0%	48,6%	1,00
Necrosis geográfica							
Ausente	156	8	164	76,5%	80,0%	76,6%	
Presente	48	2	50	23,5%	20,0%	23,4%	1,00

p: probabilidad asociada, según prueba exacta de Fisher

\* Presenta diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

• Variables inmunohistoquímicas

La **tabla 12** describe la frecuencia absoluta y la frecuencia porcentual de las variables inmunohistoquímicas (BCL6, MUM1/IRF4 y CD10) y subgrupo de origen al aplicar algoritmo de Hans a las mismas variables, de la población en estudio de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER. Únicamente se encontró diferencia significativa para la variable CD10 con una p de 0,01.

**Tabla 12.**

*Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de BCL6, MUM1/IRF4 y CD10 por inmunohistoquímica en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER*

Expresiones de marcadores	Expresión de EBER						p
	Frecuencia absoluta			Frecuencia porcentual			
	Negativo	Positivo	Subtotal	Negativo	Positivo	Subtotal	
Total	100,0%	100,0%	100,0%	204	10	214	
BCL6							
Negativo	11,8%	20,0%	12,1%	24	2	26	
Positivo	88,2%	80,0%	87,9%	180	8	188	0,48
MUM1/IRF4							
Negativo	35,3%	30,0%	35,0%	72	3	75	
Positivo	64,7%	70,0%	65,0%	132	7	139	1
CD10							
Negativo	54,4%	100,0%	56,5%	111	10	121	
Positivo	45,6%	0,0%	43,5%	93	0	93	0,01 *
Subgrupo de origen							
GCB	56,4%	30,0%	55,1%	115	3	118	
No GCB	43,6%	70,0%	44,9%	89	7	96	0,12

p: probabilidad asociada, según prueba exacta de Fisher

\* Presenta diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

La **tabla 13** describe la frecuencia absoluta y la frecuencia porcentual de las variables inmunohistoquímicas (CD20, BCL2, LMP-1, MYC y CD30), de la población en estudio de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER.

**Tabla 13.**

*Frecuencia absoluta y porcentual de la expresión de variables inmunohistoquímicas en el linfoma difuso de células B grandes, según expresión de EBER*

Variables inmuno- histoquímicas	Expresión de EBER						p
	Frecuencia absoluta			Frecuencia porcentual			
	Negativo	Positivo	Subtotal	Negativo	Positivo	Subtotal	
Total	204	10	214	100,0%	100,0%	100,0%	
CD20							
Negativo	3		3	1,5%	0,0%	1,4%	
Positivo	201	10	211	98,5%	100,0%	98,6%	1,00
BCL2							
Negativo	32	4	36	15,7%	40,0%	16,8%	
Positivo	172	6	178	84,3%	60,0%	83,2%	0,07
LMP-1							
Negativo	198	7	205	97,1%	70,0%	95,8%	
Positivo	6	3	9	2,9%	30,0%	4,2%	0,05*
MYC							
Negativo	62	3	65	30,4%	30,0%	30,4%	
Positivo	142	7	149	69,6%	70,0%	69,6%	1,00

**CD30**

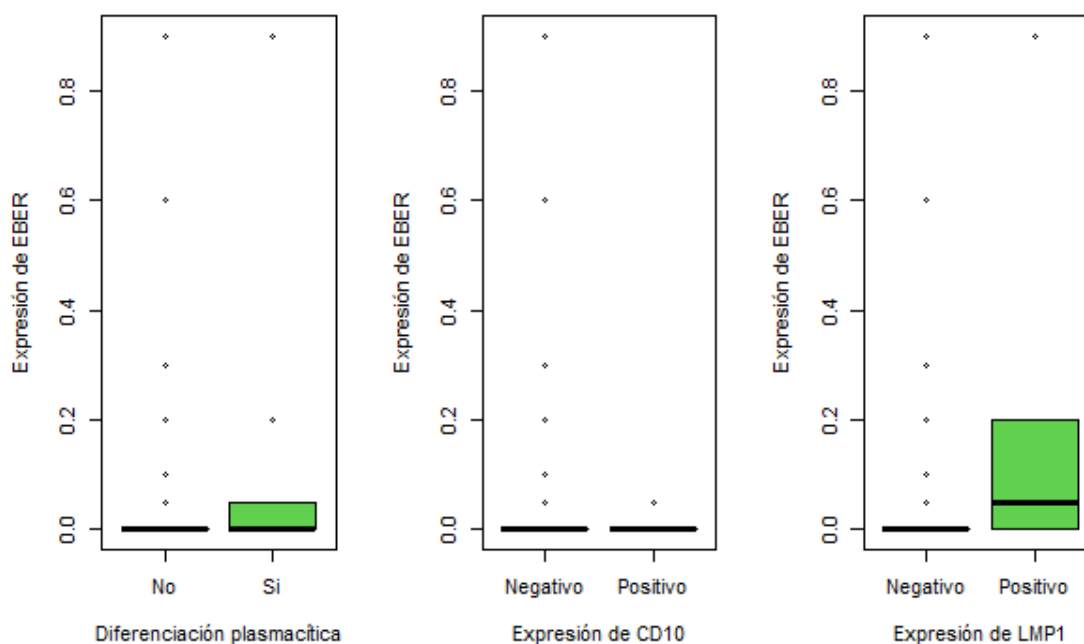
Negativo	175	5	180	85,8%	50,0%	84,1%	
Positivo	29	5	34	14,2%	50,0%	15,9%	0,11

p: probabilidad asociada, según prueba exacta de Fisher

\* Presenta diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

La **figura 6** muestra los diagramas de cajas de las variables que mostraron dependencia con la variable expresión de EBER, según la prueba exacta de Fisher. Estas variables fueron diferenciación plasmácica, CD10 y LMP-1, todas muestran alta variabilidad de los datos y todas muestran sobreposición de las cajas.



**Figura 6. Diagrama de cajas de las variables que mostraron dependencia con la variable expresión de EBER, según la prueba exacta de Fisher.**

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.



Con base en la sobreposición de las cajas mostrado para las tres variables en los diagramas anteriores, la alta variabilidad de los datos y dado el bajo número de casos con expresión de EBER se consideró que no es estadísticamente adecuado realizar la regresión logística. Por lo tanto, se procedió a realizar las pruebas para determinar la asociación de las variables en estudio con la variable expresión de EBER. Las asociaciones fueron realizadas tanto para la variable expresión de EBER categórica (positivo/negativo) como para la variable EBER nominal (porcentaje).

La **tabla 14** muestra las asociaciones entre la variable expresión de EBER y el resto de las variables de interés: sociodemográficas, morfológicas, clínicas e inmunohistoquímicas. Para las asociaciones entre variables categóricas se utilizó el coeficiente Phi o coeficiente de correlación de Mathews ( $\phi$ ). Para las asociaciones entre variables categóricas con continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ). Para las asociaciones entre variables continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ).

**Tabla 14.**

*Asociación entre la variable expresión de EBER y resto de variables de interés: sociodemográficas, morfológicas, clínicas e inmunohistoquímicas*

Variable	EBER			
	Positivo / Negativo		Porcentaje	
	Asociación	p	Asociación	p
<b>Variables sociodemográficas</b>				
Edad	$\rho = 0,045$	0,514	$r = 0,001$	0,983
Sexo	$\varphi = 0,0886$	0,195	$\rho = 0,046$	0,503
<b>Variables morfológicas</b>				
Angioinvasión	$\varphi = 0,0271$	0,692	$\rho = -0,095$	0,167
Tipo de infiltrado	$\varphi = 0,0601$	0,379	$\rho = -0,051$	0,246
Diferenciación plasmacítica	$\varphi = 0,1722$	<b>0,012*</b>	$\rho = 0,095$	0,167
Células Hodgkin/Reed-Sternberg	$\varphi = 0,0062$	0,928	$\rho = 0,003$	0,971
Necrosis geográfica	$\varphi = -0,0176$	0,797	$\rho = -0,019$	0,785
<b>Variable clínica</b>				
Localización anatómica	$\varphi = -0,0029$	0,966	$\rho = 0,059$	0,773
<b>Variables inmunohistoquímicas</b>				
CD20	$\varphi = 0,0264$	0,699	$\rho = 0,054$	0,429
BCL2	$\varphi = -0,1372$	<b>0,045*</b>	$\rho = -0,07$	0,307
LMP-1	$\varphi = 0,2845$	<b>0,000*</b>	$\rho = 0,2260$	<b>0,001*</b>
Ki-67	$\rho = 0,025$	0,716	$r = 0,059$	0,390
MYC	$\varphi = 0,0018$	0,979	$\rho = 0,007$	0,917
CD10	$\varphi = -0,1941$	<b>0,005*</b>	$\rho = -0,2340$	<b>0,001*</b>
CD30	$\varphi = 0,2066$	<b>0,003*</b>	$\rho = 0,1820$	<b>0,007*</b>
BLC6	$\varphi = -0,0532$	0,436	$\rho = -0,023$	0,741
MUM1/IRF4	$\varphi = 0,0234$	0,732	$\rho = 0,075$	0,278
Subgrupo de origen	$\varphi = 0,1119$	0,102	$\rho = -0,1620$	<b>0,018*</b>

$\rho$  = coeficiente de Spearman,  $r$  = coeficiente de Pearson,  $\varphi$  = coeficiente de Mathews  
 p: probabilidad asociada, \* Presenta diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia a partir de la información recolectada de las bases de datos y pruebas de muestras de pacientes de los hospitales en estudio.

A continuación se describen las asociaciones estadísticamente significativas según el sentido y el nivel de correlación. Para el nivel de correlación se utilizó la escala de cuartiles de la siguiente manera: 0,01 a 0,25 muy baja, 0,26 a 0,50 baja, 0,51 a 0,75 alta, 0,76 a 1,00 muy alta.

- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja y directamente proporcional ( $\phi = 0,1722$ ,  $p = 0,012$ ), entre la variable diferenciación plasmácica y la variable expresión de EBER positivo.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja e inversamente proporcional ( $\phi = -0,1372$ ,  $p = 0,045$ ), entre la variable expresión de BCL2 y la variable expresión de EBER positivo.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa, baja y directamente proporcional ( $\phi = 0,2845$ ,  $p = 0,000$ ), entre la variable expresión de LMP-1 y la variable expresión de EBER positivo.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja e inversamente proporcional ( $\phi = -0,1941$ ,  $p = 0,005$ ), entre la variable expresión de CD10 y la variable expresión de EBER positivo.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja y directamente proporcional ( $\phi = 0,2066$ ,  $p = 0,003$ ), entre la variable expresión de CD30 y la variable expresión de EBER positivo.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja y directamente proporcional ( $\rho = 0,2260$ ,  $p = 0,001$ ), entre la variable expresión de LMP-1 y la variable expresión de EBER porcentual.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja e inversamente proporcional ( $\rho = -0,2340$ ,  $p = 0,001$ ), entre la variable expresión de CD10 y la variable expresión de EBER porcentual.
- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja y directamente proporcional ( $\rho = 0,1820$ ,  $p = 0,007$ ), entre la variable expresión de CD30 y la variable expresión de EBER porcentual.

- Se encontró una relación estadísticamente significativa, muy baja e inversamente proporcional ( $\rho = -0,1620$ ,  $p = 0,018$ ), entre la variable subgrupo de origen y la variable expresión de EBER porcentual.

## DISCUSIÓN

### LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES, SIN OTRA ESPECIFICACIÓN

La edad media al diagnóstico del linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, se describe en la literatura en la séptima década de vida. La población en estudio presentó una edad media de 67 años, lo cual está acorde con lo descrito. (Hsi, 2018, pp. 271) (Li *et al.*, 2018, p. 75)

No se encontró incidencia de la variable sexo en la población de estudio, siendo 50% hombres y 50% mujeres. Cohen *et al* no encontraron predominancia por sexo en un estudio en Argentina. (Cohen *et al.*, 2014, p. 2818) En la literatura en general se describe predominancia en hombres. (Hsi, 2018, pp. 271)

El origen geográfico de los pacientes en estudio correspondió principalmente al Gran Área Metropolitana, siendo San José la provincia con mayor representación (30,4%). No se cuenta con estudios nacionales que describan alguna relación de este linfoma con la zona geográfica. Además, debe tomarse en consideración que la población de estudio no representó la totalidad de la extensión del territorio nacional, esto porque no incluyó el Hospital Calderón Guardia, el cual tiene como área de atracción la población de las provincias de Cartago y Limón.

La infiltración a médula ósea representó 7,9% de los casos (concordante) y 0,5% de los casos (discordante), para un total de 8,4%. Se describe en la literatura una frecuencia de 10 - 20 % de compromiso de médula ósea, incluyendo tanto la forma concordante (compromiso por linfoma difuso de células B grandes) y la forma discordante (compromiso por linfoma de células B de bajo grado). (Li *et al.*, 2018, p. 75) (Martelli *et al.*, 2013, p. 154) (Hsi, 2018, pp. 274) El menor porcentaje de compromiso de médula ósea que presentó la población de estudio puede estar en relación con el alto porcentaje de casos (32,7%) en los que no se documentó toma de biopsia de médula ósea en las bases de datos.

La población en estudio mostró 40,7% de localización ganglionar y 59,3% de localización extraganglionar, siendo los sitios extraganglionares más afectados el tracto gastrointestinal, tejidos blandos y hueso, sistema nervioso central y amígdala. Se describe en la literatura entre 60 - 71% de compromiso extraganglionar en el curso de la enfermedad, siendo los sitios más comúnmente afectados el tracto gastrointestinal y el anillo de Waldeyer. (Cohen *et al.*, 2014, p. 2818) (Jaffe *et al.*, 2016, pp. 416) Se debe tomar en consideración que en el presente estudio únicamente se

recopiló información de las bases de datos de los servicios de Patología, por lo tanto el menor porcentaje de compromiso extraganglionar puede estar en relación con la información disponible en la revisión completa de los expedientes clínicos. Los sitios extraganglionares más afectados, corresponden a los descritos en la literatura, ya que no se toman en consideración tejidos blandos, hueso y sistema nervioso central, porque representan entidades separadas incluidas en la subclasificación de este linfoma, dado los hallazgos clínicos y biológicos distintivos. (Jaffe et al., 2016, pp. 417)

Se observó angioinvasión en 43,9% de los casos, infiltrado polimórfico en 56,5% de los casos, diferenciación plasmacítica en 8,4% de los casos, células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg en 48,6% de los casos y necrosis geográfica en 23,4% de los casos. Estos hallazgos morfológicos no se describen con detalle porcentual en la literatura sobre el linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, son de mayor interés para la descripción morfológica de la variante EBER positiva. Sin embargo, se describe frecuente necrosis coagulativa (Jaffe et al., 2016, pp. 417), mayoría corresponden a una mezcla de centroblastos e inmunoblastos (Jaffe et al., 2016, pp. 418), ocasionalmente diferenciación plasmacítica (Jaffe et al., 2016, pp. 420) y células tipo Hodgkin/Reed-Sternberg en la variante anaplásica. (Hsi, 2018, pp. 274)

El estudio de inmunohistoquímica mostró 43,5% positividad para CD10, 87,9% positividad para BCL6 y 65% expresión de MUM1/IRF4. Según aplicación del algoritmo de Hans, 55,1% origen centro germinal y 44,9% origen no centro germinal o activado. Se describe en la literatura expresión de CD10 en 25 - 50% de casos, BCL6 en 50 - 90% de casos y MUM1/IRF4 en 35 - 65% de casos. (Hsi, 2018, pp. 274) Se observa concordancia con los tres marcadores de inmunohistoquímica descritos en la literatura.

Para la clasificación según la diferenciación de la célula de origen, se establecen los porcentajes según patrones de expresión génica usando microarreglos de ADN, siendo 50% el grupo de células B del centro germinal (GCB), 30 - 40% el grupo de célula B activada (no-GCB o ABC) y 15 - 20% el grupo no clasificable. (Jaffe et al., 2016, pp. 425) La aplicación del algoritmo de Hans usando los patrones de expresión inmunohistoquímica de CD10, BCL6 y MUM1/IRF4 tienen aproximadamente 80 - 86% de concordancia con la clasificación según patrones de expresión génica. (Hsi, 2018, pp. 274) Los resultados obtenidos en este estudio corresponden con lo descrito en la literatura médica.

Los otros marcadores de inmunohistoquímica realizados mostraron 98,6% positividad para CD20; 83,2% expresión de BCL2; 4,2% expresión de LMP-1; 69,6% expresión de MYC y 15,9% expresión de CD30. El índice de proliferación celular dado por la expresión de Ki-67 fue de 80% en promedio. Hsi *et al* describen expresión de marcadores de línea B (CD20) en la mayoría de casos, CD30 en 10 - 40% de casos y Ki-67 altamente variable (de 30 a más de 95%). (Hsi, 2018, pp. 274) La positividad para la proteína MYC varía ampliamente en un rango de 12 - 65%, lo cual se relaciona con los valores de corte utilizados, siendo > 40% el más popular. La proteína BCL2 se expresa en 50% de los casos, las variaciones se explican por los diferentes niveles de corte y los diferentes anticuerpos usados. (Jaffe *et al.*, 2016, pp. 424) La expresión de LMP-1 se describe en 10% de los casos. (Ishtiaq *et al.*, 2013, p. 3964)

#### **LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES, EBER POSITIVO**

La expresión de virus Epstein-Barr (EBER) por hibridación *in situ* cromogénica (CISH) fue de 4,7% de los casos. Hong *et al* describió que el LDCBG EBV positivo de los ancianos es más común en los países asiáticos y latinos (8,9 a 14,9%) en comparación con los países occidentales (<5%). (Hong, Ko, *et al.*, 2015, p. 393) Además, señaló algunos errores en la interpretación de los datos de prevalencia en esta patología. El primero es la ausencia de un límite de edad establecido para el LDCBG VEB positivo de los ancianos. La mayoría de los casos de LDCBG VEB positivo en ancianos ocurren después de los 60 años, y la edad de corte se estableció en más de 50 años de forma arbitraria, sin pruebas firmes. El segundo escollo es la ausencia de criterios uniformes para la expresión positiva de ARN codificado por VEB (EBER). Muchos informes utilizaron el límite de EBER positivo de más del 20%, mientras que otros usaron el límite de más del 30%, más del 50% o casi todas las células tumorales. Los criterios definitivos de positividad de EBER en el LDCBG VEB positivo de los ancianos siguen siendo controvertidos. (Hong, Ko, *et al.*, 2015, p. 393)

En el presente estudio se utilizó como edad de corte 50 años, siendo la más utilizada en la literatura revisada. Sin embargo, al conocer la nueva clasificación publicada por la Organización Mundial de la Salud en el año 2016, se consideró modificar la edad de corte. Sin embargo, por problemas logísticos y de presupuesto se decidió, en conjunto con las tutoras, dejar el estudio tal como se planeó inicialmente.

En cuanto al límite para expresión positiva de ARN codificado por VEB (EBER), se definió en 20% con base en los estudios revisados. Aún utilizando el punto más bajo de corte, el porcentaje de positividad obtenido fue de 4,7%, el cual correlaciona más con países occidentales que con los países latinos. (ver **tabla 1**)

La edad media al diagnóstico fue de 69 años, en un rango de 55 a 72 años. En los estudios previos se define una edad media en un rango de 49 - 75 años. (Beltran, Castillo, Morales, *et al.*, 2011, p. 664) (Marques-Piubelli *et al.*, 2020, p. 44) (Ziarkiewicz *et al.*, 2015, p. 163)

La proporción de hombres a mujeres fue de 2,3:1. Esta neoplasia es más frecuente en hombres, con una proporción de hombres a mujeres de 2,5:1 independientemente de la edad. (Beltran, Castillo, Morales, *et al.*, 2011, p. 664) (Hofscheier *et al.*, 2011, p. 1048) (Marques-Piubelli *et al.*, 2020, p. 44) (Yoshino *et al.*, 2006, p. 164) (Ziarkiewicz *et al.*, 2015, p. 163) Este parámetro clínico se ajusta a lo descrito.

En cuanto al origen geográfico de los pacientes, se observó gran variabilidad en los datos conocidos y un alto porcentaje (60%) de ausencia de información en las bases de datos. Además, no hay un estudio costarricense reportado a la fecha que asocie esta variante del linfoma difuso de células B grandes con el origen geográfico.

El análisis morfológico de los casos EBER positivos mostró 50% de angioinvasión, 70% de infiltrado polimórfico, 30% de diferenciación plasmacítica, 50% de células Hodgkin/Reed-Sternberg y 20% de necrosis geográfica. Se describe en estudios previos 29 - 77% casos con necrosis geográfica, 13 - 59% casos con angioinvasión/angiodestrucción, 51 - 100% casos con células Hodgkin/Reed-Sternberg, 50 - 98% casos con infiltrado polimórfico y 18 - 50% diferenciación plasmacítica. (Aladily *et al.*, 2019, p. 151406) (Asano *et al.*, 2009, p. 2630) (Beltran, Castillo, Morales, *et al.*, 2011, p. 664) (Chang *et al.*, 2013, p. 327) (Cohen *et al.*, 2014, p. 2818) (Dojcinov *et al.*, 2011, p. 4728) (Gibson & Hsi, 2009, p. 657) (Hoeller *et al.*, 2010, p. 355) (Hofscheier *et al.*, 2011, p. 1049) (Montes-Moreno *et al.*, 2012, p. 971) (Oyama *et al.*, 2003, p. 18) (Pan *et al.*, 2012, p. 301) (UNER *et al.*, 2011, p. 311) (Wada *et al.*, 2010, p. 319)

Se encontró 40% de afectación ganglionar y 60% de afectación extraganglionar, siendo el tracto gastrointestinal (20%), la piel (10%), la amígdala (10%) y la glándula parótida (10%) los sitios extraganglionares más afectados. La literatura describe afectación extraganglionar (25 - 80%), con preferencia por el tracto gastrointestinal (15 - 40%), piel (13 - 18%), pulmón (9 - 12%) y



amígdala (8 - 25%). (Beltrán et al., 2011, p. 286) (Cohen et al., 2014, p. 2818) (Dojcinov et al., 2011, p. 4727) (Hoeller et al., 2010, p. 355) (C.-H. Lu et al., 2014, p. 1166) (Montes-Moreno et al., 2012, p. 970) (Oyama et al., 2007, p. 5127) (Shimoyama et al., 2009, p. 839) (UNER et al., 2011, p. 311) Los datos obtenidos se ajustan a lo descrito en estudios de otras latitudes.

Se documentó infiltración de médula ósea en 10% de los casos, lo cual está en el rango descrito (4,1 - 50%) en los estudios previos. (Montes-Moreno et al., 2012, p. 971) (Ozsán et al., 2013, p. 473) (Park et al., 2007, p. 974) (Ziarkiewicz et al., 2015, p. 161) Sin embargo debe tenerse en consideración el 40% de casos en los que no se documentó biopsia de médula ósea en las bases de datos, por lo que se requiere de estudios que incluyan revisión de expedientes clínicos para recabar la información faltante.

El promedio de expresión de ácidos ribonucleicos tempranos del virus Epstein-Barr (EBER) fue 53%. Este es un dato que no se constata en la literatura revisada, ya que únicamente se reporta el porcentaje de casos con expresión según el corte utilizado. Se consideró importante incluirlo para tener un parámetro más objetivo a la hora de seleccionar el porcentaje de corte a utilizar.

El estudio de inmunohistoquímica mostró expresión de CD20 en 100% de casos, BCL2 en 60%, LMP-1 en 30%, MYC en 70% y CD30 en 50%. Los porcentajes de expresión reportados en los estudios son 83 - 100% (CD20), 22 - 96% (BCL2), 27 - 94% (LMP-1), 20 - 86% (MYC) y 29 - 92% (CD30). El promedio de índice de proliferación celular dado por expresión de Ki-67 reportado es 50 - 90%. (Beltran, Castillo, Morales, et al., 2011, p. 664) (Dojcinov et al., 2011, p. 4728) (Gibson & Hsi, 2009, p. 657) (Hoeller et al., 2010, p. 356) (Montes-Moreno et al., 2012, p. 972) (Ok et al., 2015, p. 13935) (Oyama et al., 2003, p. 20) (Shimoyama et al., 2008, p. 1087) (Song et al., 2015, p. 4) (Ziarkiewicz et al., 2015, p. 163) Sólo se encontró en la literatura revisada dos reportes de MYC en LDCBG EBER positivo (20% y 86%), este criterio fue incluido en la actualización de la clasificación del 2016 por la Organización Mundial de la Salud, ya que se considera un indicador pronóstico. (Swerdlow et al., 2016, p. 2381) (Swerdlow et al., 2017, pp. 235)

La positividad de los marcadores de inmunohistoquímica asociados al subgrupo de origen fue de 0% (CD10), 80% (BCL6) y 70% (MUM1/IRF4). Al aplicar el algoritmo de Hans, se encontró 30% casos con origen centro germinal (GCB) y 70% casos con origen no centro germinal o activado (no-GCB o ABC). Los estudios de otras latitudes describen 0 - 40% expresión de CD10, 31 - 83% expresión de BCL6, 66 - 100% expresión de MUM1/IRF4, 25 - 50% casos de origen centro germinal y 50 - 95% casos de origen no centro germinal o activado. (Ahn et al., 2013, p. 776)

(Aladily et al., 2019, p. 151406) (Beltran, Castillo, Morales, et al., 2011, p. 666) (Chang et al., 2013, p. 327) (Gebauer et al., 2014, p. 1103) (Hoeller et al., 2010, p. 356) (Hofscheier et al., 2011, p. 1049) (Jamal et al., 2014, p. 271) (Kuze et al., 2000, p. 1234) (C.-H. Lu et al., 2014, p. 1166) (Montes-Moreno et al., 2012, p. 973) (Morales et al., 2009, p. 68) (Ok et al., 2014, p. 2340) (Ok et al., 2015, p. 13935) (Oyama et al., 2003, p. 20) (Oyama et al., 2007, p. 5127) (Ozsan et al., 2013, p. 473) (Pan et al., 2012, p. 301) (Park et al., 2007, p. 973) (Sato et al., 2014, p. 1172) (Song et al., 2015, p. 4) (UNER et al., 2011, p. 311)

Se encontró diferencia estadísticamente significativa, según expresión de EBER, para las variables diferenciación plasmacítica, expresión de CD10 y expresión de LMP-1. En los estudios revisados que incluyen análisis estadístico inferencial, sólo Oyama *et al* encontraron diferencia significativa para expresión de CD10 y Shimoyama *et al* para expresión de LMP-1. No se encontró diferencia significativa para diferenciación plasmacítica en ninguno de los estudios previos. (Oyama et al., 2007, p. 5127) (Shimoyama et al., 2009, p. 837)

Se ha descrito en la literatura diferencia significativa con otras variables del estudio. Ahn *et al* detectaron diferencias significativas en sexo (predominancia en hombres) y subgrupo no centro germinal. (Ahn et al., 2013, p. 776) Asano *et al* determinaron diferencias significativas para edad (mayores de 60 años), sexo (hombres), compromiso extraganglionar (piel, tracto gastrointestinal, pulmón), necrosis geográfica, aumento de linfocitos T citotóxicos y expresión de CD20. (Asano et al., 2009, p. 2630) Chang *et al* determinaron diferencia significativa en peor supervivencia total para mayores de 50 años y expresión de BCL-6. (Chang et al., 2013, p. 327) Dojcinov et al determinaron diferencia significativa para sexo (hombres) y compromiso extraganglionar. (Dojcinov et al., 2011, p. 4731) Hoeller *et al* encontró significancia estadística en la expresión de CD30. (Hoeller et al., 2010, p. 356) Hong *et al* demostraron diferencia significativa en edad (mayor de 50 años), compromiso extraganglionar, peor supervivencia total (media de 17,3 meses) y peor supervivencia libre de progresión (media de 8,6 meses). (Hong, Yoon, et al., 2015, p. 551) Kuze *et al* demostraron diferencia significativa en la expresión de CD30 y en la expresión de BCL-6. (Kuze et al., 2000, p. 1235) Lu *et al* definieron significancia estadística para edad (mayor a 60 años), estadio clínico avanzado (III - IV) y subgrupo no centro germinal o ABC. (C.-H. Lu et al., 2014, p. 1167) Lu *et al* encontraron diferencia significativa para sexo (hombres), estadio clínico avanzado (III - IV), expresión de BCL-6, expresión de CD30, alto índice de proliferación celular (Ki-67 mayor a 70%), peor supervivencia total (media de 18,3 meses) y peor supervivencia libre de progresión (media de 9,8 meses). (T.-X. Lu et al., 2015, p. 12168) Ok *et al*

encontraron diferencia significativa en expresión de CD30, expresión de p50, expresión de pSTAT3 y expresión de BCL-6. (Ok et al., 2014, p. 2343) Ok *et al* demostraron significancia estadística para edad (mayores de 50 años), expresión de BCL-6 (menores y mayores de 50 años) y expresión de CD30, p50 y pSTAT3 (mayores de 50 años). (Ok et al., 2015, p. 13935) Oyama *et al* evidenciaron diferencia significativa en edad (mayor a 45 años), compromiso extraganglionar (piel, amígdala y mama), expresión de CD30 y expresión de CD10. (Oyama et al., 2007, p. 5127) Pan *et al* identificaron significancia estadística para sexo (hombres), edad (mayor a 50 años) y subgrupo no centro germinal. (Pan et al., 2012, p. 299) Park *et al* demostraron diferencia significativa para edad (mayor de 60 años), estadio clínico avanzado, compromiso extraganglionar, síntomas B y pobre respuesta al tratamiento inicial. (Park et al., 2007, p. 973) Purwanto *et al* identificaron correlación estadísticamente significativa entre expresión de BCL-2 y localización ganglionar. (Purwanto, et al., 2006, p. 78) Sato *et al* hallaron diferencia significativa para peor supervivencia total y supervivencia libre de progresión. (Sato et al., 2014, p. 1173) Shimoyama *et al* encontraron diferencia significativa para edad (mayor de 60 años), sexo (hombres), compromiso extraganglionar (piel, tracto gastrointestinal y bazo), nivel alto de DHL, presencia de síntomas B, expresión de CD20, expresión de CD15, expresión de CD30, expresión de LMP-1 y expresión de EBNA-2. (Shimoyama et al., 2009, p. 837) Song *et al* demostraron significancia estadística para expresión de Ki-67 mayor a 80%, subgrupo no centro germinal y expresión de CD30. (Song et al., 2015, p. 5) Ziarkiewicz *et al* encontró diferencias significativas para expresión de BCL-6 y expresión de CD30. (Ziarkiewicz et al., 2015, p. 163)

Al aplicar los coeficientes de correlación (Mathews, Spearman, Pearson) se determinaron otras asociaciones estadísticamente significativas, sumadas a las ya descritas anteriormente. Para la variable EBER categórica (positivo/negativo) se observó asociación significativa con expresión de BCL2, LMP-1, CD10, CD30 y diferenciación plasmacítica. Para la variable EBER nominal (porcentaje de expresión) se encontró asociación significativa con expresión de LMP-1, CD10, CD30 y subgrupo de origen. En los estudios revisados no se encontró este tipo de asociaciones, las cuales describen el sentido y el nivel de asociación en cada caso. Además, los estudios previos utilizan únicamente la variable categórica, basada en un punto de corte definido previamente como positivo, el cual es diferente en los distintos estudios.

La principal limitación que se presentó para la realización del presente trabajo fue el tamaño de la muestra de la variante del LDCBG EBER positivo, ya que al corresponder a un bajo porcentaje de la población de LDCBG sin otra especificación, se requiere de una mayor envergadura del

estudio para obtener una muestra que permita la aplicación de la regresión logística en la predicción de EBER positivo.

Otra limitación fue la falta de datos en las variables infiltración de médula ósea y procedencia geográfica, lo cual no permitió la aplicación de la prueba exacta de Fisher para determinar la asociación estadística con la variable EBER. Esta limitación se podría solventar con la revisión de expedientes clínicos, o incluso con el sistema nacional ARCA en los servicios de Patología, lo cual contribuirá en estudios subsecuentes.

No se determinó ningún sesgo asociado a la investigación. El sesgo muestral o de selección no aplicó porque no hubo preferencia al incluir o excluir los resultados, se incluyó la totalidad.

El presente estudio constituye la primera descripción en Costa Rica del linfoma difuso de células B grandes, sin otra especificación, el cual reúne variables sociodemográficas, morfológicas e inmunohistoquímicas. Además, incluye la utilización de la prueba de hibridación *in situ* cromogénica (EBER) para determinar la frecuencia del subtipo virus Epstein-Barr positivo. Dada la envergadura del estudio y la amplia gama de variables analizadas, resulta importante la utilización de los resultados obtenidos, por parte de las autoridades de salud, para la optimización del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta neoplasia.

## CONCLUSIONES

### LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES, SIN OTRA ESPECIFICACIÓN

La edad media de presentación del LDCBG en la población de estudio fue 67 años. No mostró predominancia por sexo. El origen geográfico correspondió principalmente al Gran Área Metropolitana. La infiltración a médula ósea representó 8,4% de casos, siendo 7,9% de forma concordante y 0,5% de forma discordante. Se observó predominantemente localización extraganglionar, con mayor afectación de tracto gastrointestinal, tejidos blandos y hueso, sistema nervioso central y amígdala. No se documentó implicación pronóstica de los hallazgos morfológicos en el LDCBG, sin otra especificación. Los marcadores de inmunohistoquímica (CD20, BCL2, LMP-1, CD30, MYC, CD10, BCL6 y MUM1/IRF4) mostraron expresión de acuerdo a lo descrito en la literatura. Se documentó predominio del subgrupo de origen centro germinal. La expresión de virus Epstein-Barr por hibridación *in situ* cromogénica (EBER) fue 4,7%. La población de estudio mostró concordancia con la literatura en todas las variables analizadas.

### LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES, EBER POSITIVO

La edad media al diagnóstico en la subpoblación EBER positivo fue 69 años, con predominancia en hombres. El origen geográfico de los pacientes mostró alta variabilidad. Las variables sociodemográficas edad y sexo se ajustan a los parámetros descritos en estudios previos.

Se observó predominio de localización extraganglionar, siendo el tracto gastrointestinal, la piel, la amígdala y la glándula parótida los sitios más afectados. Se documentó infiltración de médula ósea en 10% de los casos. Estas variables son acordes a lo descrito en la literatura.

El promedio de expresión de ácidos ribonucleicos tempranos del virus Epstein-Barr (EBER) fue 53%. Los marcadores de inmunohistoquímica (CD20, BCL2, LMP1, CD30, MYC, BCL6, CD10, MUM1/IRF4) mostraron expresión de acuerdo a lo descrito en la literatura. La subpoblación de estudio presentó predominio del subgrupo de origen no centro germinal. Se encontró concordancia con la literatura en todas las variables inmunohistoquímicas y el subgrupo de origen.

La variable EBER categórica (positivo/negativo) mostró asociación significativa con expresión de BCL2, LMP-1, CD10, CD30 y diferenciación plasmacítica. La variable EBER nominal (porcentaje de expresión) presentó asociación significativa con expresión de LMP-1, CD10, CD30 y subgrupo

de origen. Únicamente se logró determinar asociación significativa con la variable morfológica diferenciación plasmacítica, utilizando la variable EBER categórica. No hubo significancia estadística con las variables morfológicas al utilizar la variable EBER nominal. Las variables inmunohistoquímicas LMP-1, CD10 y CD30 mostraron significancia estadística, independientemente de la forma de clasificar la variable EBER.

Se demostró mayor eficiencia con hibridación *in situ* cromogénica (CISH) para determinar infección por virus Epstein-Barr, y menor eficiencia con inmunohistoquímica para la proteína latente de membrana (LMP-1), con una significancia estadística de 0,05, con lo cual se comprobó la hipótesis nula, y por lo tanto se recomienda incluir de rutina esta herramienta diagnóstica.

Se recomienda incluir revisión de expedientes médicos para obtener mayor información clínica y completar la base de datos. Así como la realización de un estudio nacional, que abarque los tres hospitales clase A, donde se concentra el diagnóstico y el tratamiento de los linfomas. Esto porque se ha asociado esta variante del LDCBG a la etnia oriental, la cual tiene representación importante en la provincia de Limón, adscrita al Hospital Calderón Guardia.

Cabe destacar que en la actualidad, los sistemas de patología a nivel nacional utilizan el sistema unificado ARCA, el cual es más completo y más amigable para obtener información en estudios posteriores. Es importante tomar en consideración el promedio de expresión de EBER, para así determinar el porcentaje de corte que indica positividad en el estudio. La forma de clasificar la variable expresión de EBER determina cuáles asociaciones estadísticamente significativas se documentan en el estudio. Dada la baja incidencia del LDCBG VEB positivo, se recomienda utilizar una muestra más grande o utilizar otros métodos estadísticos para predecir positividad para EBER según variables sociodemográficas, clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas. En cuanto a otros métodos estadísticos para demostrar las asociaciones, se sugiere utilizar la prueba exacta de Fisher, el coeficiente de correlación de Mathews, el coeficiente de correlación de Spearman y el coeficiente de correlación de Pearson, según corresponda.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adam, P., Bonzheim, I., Fend, F., & Quintanilla-Martínez, L. (2011). Epstein-Barr Virus-positive Diffuse Large B-cell Lymphomas of the Elderly. *Advances In Anatomic Pathology*, 18(5), 349-355. <https://doi.org/10.1097/pap.0b013e318229bf08>
- Aguilar, C., Beltran, B., Quiñones, P., Carbajal, T., Vilcapaza, J., Yabar, A., Segura, P., Quintanilla-Martínez, L., Miranda, R. N., & Castillo, J. J. (2015). Large B-cell lymphoma arising in cardiac myxoma or intracardiac fibrinous mass: a localized lymphoma usually associated with Epstein-Barr virus? *Cardiovascular Pathology*, 24(1), 60-64. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2014.08.007>
- Ahn, J.-S., Yang, D.-H., Duk Choi, Y., Jung, S.-H., Yhim, H.-Y., Kwak, J.-Y., Sung Park, H., Shin, M.-G., Kim, Y.-K., Kim, H.-J., & Lee, J.-J. (2013). Clinical outcome of elderly patients with Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma treated with a combination of rituximab and CHOP chemotherapy. *American Journal of Hematology*, 88(9), 774-779. <https://doi.org/10.1002/ajh.23507>
- Aladily, T. N., Mansour, A. T., Mahgoob, R., Khoury, J. D., Oltulu, P., & Medeiros, L. J. (2019). Epstein - Barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Jordan and Turkey. *Annals of Diagnostic Pathology*, 43, 151406. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2019.151406>
- Asano, N., Yamamoto, K., Tamaru, J.-I., Oyama, T., Ishida, F., Ohshima, K., Yoshino, T., Nakamura, N., Mori, S., Yoshie, O., Shimoyama, Y., Morishima, Y., Kinoshita, T., & Nakamura, S. (2009). Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. *Blood*, 113(12), 2629-2636. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-164806>
- Au, W. Y., Trendell-Smith, N., Chow, C., & Liang, R. (2006). Senile EBER positive diffuse large B cell lymphoma relapsing in the nasopharynx. *Haematologica*, 91(1), 111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923525>
- Beltran, B. E., Castillo, J. J., Morales, D., de Mendoza, F. H., Quinones, P., Miranda, R. N., Gallo, A., Lopez-Illasaca, M., Butera, J. N., & Sotomayor, E. M. (2011). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: A case series from Peru. *American Journal of Hematology*, 86(8), 663-667. <https://doi.org/10.1002/ajh.22078>
- Beltran, B. E., Castillo, J. J., Salas, R., Quiñones, P., Morales, D., Cotrina, E., Miranda, R. N., & Sotomayor, E. M. (2011). Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone: report of two cases from South America. *Leukemia & Lymphoma*, 52(1), 153-156. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.528094>
- Beltrán, E., Quiñones-Avila, P., Morales-Luna, D., Cotrina-Montenegro, E., Gallo-López, A., & López-Illasaca, M. (2011). Gastrointestinal Epstein Barr virus positive diffuse large B cell lymphoma in elderly: report of five cases and review of literature. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 31(3), 285-288. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22086324/>

- Cannatella, J. J., Vu, K., Qi, Z., Van Ziffle, J., Wang, L., Kaplan, L. D., Prakash, S., & Xie, Y. (2020). Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with Hodgkin Reed-Sternberg-like cells and subsequent transformation to EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma – A case report and literature review. *Human Pathology: Case Reports*, 20, 200379. <https://doi.org/10.1016/j.ehpc.2020.200379>
- Castillo, J. J., Beltran, B. E., Miranda, R. N., Paydas, S., Winer, E. S., & Butera, J. N. (2011). Epstein-Barr Virus–Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly: What We Know So Far. *The Oncologist*, 16(1), 87-96. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0213>
- Castillo, J. J., Beltran, B. E., Miranda, R. N., Young, K. H., Chavez, J. C., & Sotomayor, E. M. (2016). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 91(5), 529-537. <https://doi.org/10.1002/ajh.24370>
- Castillo-Quan, J. I., Kinghorn, K. J., & Bjedov, I. (2015). Genetics and Pharmacology of Longevity. *Advances in Genetics*, 1-101. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.06.002>
- Chang, S.-T., Lu, Y.-H., Lu, C.-L., Weng, S.-F., Lin, S.-H., Kuo, S.-Y., Chuang, Y.-T., Takeuchi, K., Ohshima, K., & Chuang, S.-S. (2013). Epstein–Barr virus is rarely associated with diffuse large B cell lymphoma in Taiwan and carries a trend for a shorter median survival time. *Journal of Clinical Pathology*, 67(4), 326-332. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201905>
- Chatterjee, K., Das, P., Chattopadhyay, N. R., Mal, S., & Choudhuri, T. (2019). The interplay between Epstein-Bar virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. *Heliyon*, 5(11), e02624. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02624>
- Chen, B.-J., Fend, F., Campo, E., & Quintanilla-Martinez, L. (2019). Aggressive B-cell lymphomas—from morphology to molecular pathogenesis. *Annals of Lymphoma*, 3, 1. <https://doi.org/10.21037/aol.2018.12.02>
- Chen, D., Zhou, M., Zhao, F., & Fang, X. (2014). Epstein-Barr Virus Positive Diffuse Large B-cell Lymphoma of the Elderly in Nasopharynx: Report of a Case. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 43(8), 563-564. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25346131/>
- Cho, E.-Y., Kim, K.-H., Kim, W.-S., Yoo, K. H., Koo, H.-H., & Ko, Y.-H. (2008). The Spectrum of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disease in Korea: Incidence of Disease Entities by Age Groups. *Journal of Korean Medical Science*, 23(2), 185. <https://doi.org/10.3346/jkms.2008.23.2.185>
- Chuang, S.-S., Ichinohasama, R., Yang, C.-C., Wang, W.-C., Chou, C.-K., Liao, Y.-L., Kuo, S.-Y., & Lin, S.-H. (2010). Multicentric primary intestinal EBV-positive diffuse large B cell lymphoma of the elderly presenting with perforation. *International Journal of Hematology*, 91(3), 534-538. <https://doi.org/10.1007/s12185-010-0512-1>
- Cohen, M., De Matteo, E., Narbaitz, M., Carreño, F. A., Preciado, M. V., & Chabay, P. A. (2012). Epstein-Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particu-



- lar association and latency patterns: Analysis of viral role in tumor microenvironment. *International Journal of Cancer*, 132(7), 1572-1580. <https://doi.org/10.1002/ijc.27845>
- Cohen, M., Narbaitz, M., Metrebian, F., De Matteo, E., Preciado, M. V., & Chabay, P. A. (2014). Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma association is not only restricted to elderly patients. *International Journal of Cancer*, 135(12), 2816-2824. <https://doi.org/10.1002/ijc.28942>
- Coiffier, B., Lepage, E., Brière, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P., & Gisselbrecht, C. (2002). CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 346(4), 235-242. <https://doi.org/10.1056/nejmoa011795>
- de la Hera Magallanes, A. I., Montes-Moreno, S., Hernández, S. G., Hernández-León, C. N., Lopez, M., Pajares, R., Pinilla, S. M. R., & Piris, M. A. (2011). Early phase of Epstein-Barr virus (EBV)-positive diffuse large B cell lymphoma of the elderly mimicking EBV-positive reactive follicular hyperplasia. *Histopathology*, 59(3), 571-575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03950.x>
- De Unamuno Bustos, B., Zaragoza Ninet, V., Ballester Sánchez, R., García Rabasco, A., & Alegre de Miquel, V. (2014). Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in an elderly patient. *Clinical and Experimental Dermatology*, 39(4), 484-487. <https://doi.org/10.1111/ced.12322>
- Dojcinov, S. D., Venkataraman, G., Pittaluga, S., Wlodarska, I., Schrager, J. A., Raffeld, M., Hills, R. K., & Jaffe, E. S. (2011). Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood*, 117(18), 4726-4735. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323238>
- Dolcetti, R. (2015). Cross-talk between Epstein-Barr virus and microenvironment in the pathogenesis of lymphomas. *Seminars in Cancer Biology*, 34, 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.04.006>
- Dong, M., Chen, J., Huang, J., Gong, L., & Shao, C. (2019). The roles of EBV-encoded microRNAs in EBV-associated tumors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 135, 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.01.014>
- Elgui de Oliveira, D., Müller-Coan, B. G., & Pagano, J. S. (2016). Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers. *Trends in Microbiology*, 24(8), 649-664. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.008>
- Eminger, L. A., Hall, L. D., Hesterman, K. S., & Heymann, W. R. (2015). Epstein-Barr virus: Dermatologic associations and implications. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 72(1), 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.07.035>
- Forte, E., & Luftig, M. A. (2011). The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes and Infection*, 13(14-15), 1156-1167. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.007>

- Frost, T. C., & Gewurz, B. E. (2018). Epigenetic crossroads of the Epstein-Barr virus B-cell relationship. *Current Opinion in Virology*, 32, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.012>
- Gebauer, N., Gebauer, J., Hardel, T. T., Bernard, V., Biersack, H., Lehnert, H., Rades, D., Feller, A. C., & Thorns, C. (2014). Prevalence of targetable oncogenic mutations and genomic alterations in Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leukemia & Lymphoma*, 56(4), 1100-1106. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.944522>
- Gibson, S. E., & Hsi, E. D. (2009). Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma of the elderly at a United States tertiary medical center: an uncommon aggressive lymphoma with a non-germinal center B-cell phenotype. *Human Pathology*, 40(5), 653-661. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.10.007>
- Grimm, K. E., & O'Malley, D. P. (2019). Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Annals of Diagnostic Pathology*, 38, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.09.014>
- Grywalska, E., & Rolinski, J. (2015). Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomas. *Seminars in Oncology*, 42(2), 291-303. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.030>
- Gulley, M. L., & Tang, W. (2008). Laboratory Assays for Epstein-Barr Virus-Related Disease. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10(4), 279-292. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>
- Guo, L., Lin, P., Xiong, H., Tu, S., & Chen, G. (2018). Molecular heterogeneity in diffuse large B-cell lymphoma and its implications in clinical diagnosis and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1869(2), 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.01.001>
- Gutiérrez, A., Mestre, F., Pérez-Manga, G., & Rodríguez, J. (2011). Diffuse large B-cell lymphoma in the older. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 78(1), 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.02.009>
- Hakim, F. T., & Gress, R. E. (2007). Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens*, 70(3), 179-189. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00891.x>
- Hans, C. P. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275-282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
- Hoeller, S., Tzankov, A., Pileri, S. A., Went, P., & Dirnhofer, S. (2010). Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. *Human Pathology*, 41(3), 352-357. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.024>
- Hofscheier, A., Ponciano, A., Bonzheim, I., Adam, P., Lome-Maldonado, C., Vela, T., Cortes, E., Ortiz-Hidalgo, C., Fend, F., & Quintanilla-Martinez, L. (2011). Geographic variation in the

- prevalence of Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population. *Modern Pathology*, 24(8), 1046-1054. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.62>
- Hong, J. Y., Ko, Y. H., Kim, S. J., & Kim, W. S. (2015). Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Current Opinion in Oncology*, 27(5), 392-398. <https://doi.org/10.1097/cco.0000000000000210>
- Hong, J. Y., Yoon, D. H., Suh, C., Huh, J., Do, I.-G., Sohn, I., Jo, J., Jung, S.-H., Hong, M. E., Yoon, H., Ko, Y. H., Kim, S. J., & Kim, W. S. (2015). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma in young adults: is this a distinct disease entity? *Annals of Oncology*, 26(3), 548-555. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu556>
- Hori, Y., Yamamoto, H., Nozaki, Y., Torisu, T., Fujiwara, M., Taguchi, K., Nishiyama, K., Nakamura, S., Kitazono, T., & Oda, Y. (2020). Colorectal diffuse large B-cell lymphoma: molecular subclassification and prognostic significance of immunoglobulin gene translocation. *Human Pathology*, 96, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.09.003>
- Hsi, E. (2018). *Hematopathology* (Third edition ed.). Elsevier.
- Huang, Y.-H., Wu, Q.-L., Zong, Y.-S., Kuang, Y.-L., & Lu, J.-B. (2010). Nasopharyngeal EBV-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma Occurring in Elderly: Report of a Case. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 39(9), 634. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21092596/>
- Hwang, Y.-Y., Leung, A. Y. H., Lau, W.-H., Loong, F., So, J. C. C., Tse, E., & Kwong, Y.-L. (2011). Synchronous Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly and Epstein-Barr virus-positive classical Hodgkin lymphoma. *Histopathology*, 59(2), 352-355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03905.x>
- Ishtiaq, S., Hassan, U., Mushtaq, S., & Akhtar, N. (2013). Determination of Frequency of Epstein-Barr Virus in Non-Hodgkin Lymphomas Using EBV Latent Membrane Protein 1 (EBV-LMP1) Immunohistochemical Staining. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(6), 3963-3967. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.6.3963>
- Ito, T., Fujisaki, H., Nishio, S., Hiroshige, S., Miyazaki, E., & Kadota, J. (2014). Tracheal ulcer due to Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Respiratory Investigation*, 52(2), 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2013.08.007>
- Iwakiri, D. (2016). Multifunctional non-coding Epstein–Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis. *Virus Research*, 212, 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.virus-res.2015.08.007>
- Jaffe, E. S., Arber, D., Campo, E., Quintanilla-Fend, L., & Orazi, A. (2016). *Hematopathology* (2nd Edition ed.). Elsevier.
- Jamal, S. E., Li, S., Bajaj, R., Wang, Z., Kenyon, L., Glass, J., Pang, C. S., Bhagavathi, S., Peiper, S. C., & Gong, J. Z. (2014). Primary central nervous system Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a clinicopathologic study of five cases. *Brain Tumor Pathology*, 31(4), 265-273. <https://doi.org/10.1007/s10014-013-0173-x>

- Kato, H., Karube, K., Yamamoto, K., Takizawa, J., Tsuzuki, S., Yatabe, Y., Kanda, T., Katayama, M., Ozawa, Y., Ishitsuka, K., Okamoto, M., Kinoshita, T., Ohshima, K., Nakamura, S., Morishima, Y., & Seto, M. (2014). Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenic pathways. *Cancer Science*, 105(5), 537-544. <https://doi.org/10.1111/cas.12389>
- Kempkes, B., & Robertson, E. S. (2015). Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Current Opinion in Virology*, 14, 138-144. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.007>
- Kunitomi, A., Kotani, S., Ukyo, N., Ono, K., Nakamine, H., & Nohgawa, M. (2014). Epstein-Barr Virus-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma of the Elderly Complicated by the Onset of Acute Myeloid Leukemia. *Internal Medicine*, 53(1), 51-56. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.53.0219>
- Kuze, T., Nakamura, N., Hashimoto, Y., Sasaki, Y., & Abe, M. (2000). The Characteristics of Epstein-Barr Virus (EBV)-positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Comparison between EBV+and EBV-Cases in Japanese Population. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91(12), 1233-1240. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00909.x>
- Laing, K. G., Elia, A., Jeffrey, I., Matys, V., Tilleray, V. J., Souberbielle, B., & Clemens, M. J. (2002). In Vivo Effects of the Epstein-Barr Virus Small RNA EBER-1 on Protein Synthesis and Cell Growth Regulation. *Virology*, 297(2), 253-269. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1354>
- Lee, E., Kim, T. M., Lim, Y., Jeon, Y. K., Go, H., Kim, C. W., & Heo, D. S. (2013). Histologic Transformation of Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly. *Journal of Clinical Oncology*, 31(19), e332-e334. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.44.7375>
- Li, S., Young, K. H., & Medeiros, L. J. (2018). Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*, 50(1), 74-87. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.006>
- Liu, F., Zhang, L., Yin, W., Mei, K., & Li, X. (2015). Updates on Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-cell Lymphoma of the Elderly. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 44(2), 135-139. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25916649/>
- Lu, C.-H., Lee, K.-F., Chen, C.-C., Chen, Y.-Y., Huang, C.-E., Tsai, P.-S., Tsou, H.-Y., Chou, H.-J., Chen, M.-F., Chen, P.-T., Lee, K.-D., & Lung, J. (2014). Clinical Characteristics and Treatment Outcome in a Taiwanese Population of Patients with Epstein-Barr Virus-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 44(12), 1164-1171. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyu155>
- Lu, T.-X., Liang, J.-H., Miao, Y., Fan, L., Wang, L., Qu, X.-Y., Cao, L., Gong, Q.-X., Wang, Z., Zhang, Z.-H., Xu, W., & Li, J.-Y. (2015). Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma predict poor outcome, regardless of the age. *Scientific Reports*, 5(1), 12168. <https://doi.org/10.1038/srep12168>

- Marques-Piubelli, M. L., Salas, Y. I., Pachas, C., Becker-Hecker, R., Vega, F., & Miranda, R. N. (2020). Epstein–Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders and lymphomas: a review. *Pathology*, 52(1), 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.006>
- Martelli, M., Ferreri, A. J. M., Agostinelli, C., Di Rocco, A., Pfreundschuh, M., & Pileri, S. A. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 87(2), 146-171. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.12.009>
- Martin, B., Whittaker, S., Morris, S., & Robson, A. (2010). A Case of Primary Cutaneous Senile EBV-Related Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The American Journal of Dermatopathology*, 32(2), 190-193. <https://doi.org/10.1097/dad.0b013e3181ba9e4f>
- Menon, M. P., Pittaluga, S., & Jaffe, E. S. (2012). The Histological and Biological Spectrum of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the World Health Organization Classification. *The Cancer Journal*, 18(5), 411-420. <https://doi.org/10.1097/ppo.0b013e31826aee97>
- Miller, D. V., Firchau, D. J., McClure, R. F., Kurtin, P. J., & Feldman, A. L. (2010). Epstein-Barr Virus-associated Diffuse Large B-cell Lymphoma Arising on Cardiac Prostheses. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34(3), 377-384. <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e3181ce9128>
- Mizuno, T., Ishigaki, M., Nakajima, K., Matsue, T., Fukushima, M., Minato, H., Nojima, N., Atsushi, S., Ishigami, K., Atsumi, H., Ito, T., Iguchi, M., Usuda, D., Okamura, H., Urashima, S., Asano, M., Fukuda, A., Izumi, Y., Takekoshi, N., & Kanda, T. (2013). Spontaneous Remission of Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly. *Case Reports in Oncology*, 6(2), 269-274. <https://doi.org/10.1159/000345572>
- Montes-Moreno, S., Odqvist, L., Diaz-Perez, J. A., Lopez, A. B., de Villambrosía, S. G., Mazorra, F., Castillo, M. E., Lopez, M., Pajares, R., García, J. F., Mollejo, M., Camacho, F. I., Ruiz-Marcellán, C., Adrados, M., Ortiz, N., Franco, R., Ortiz-Hidalgo, C., Suarez-Gauthier, A., Young, K. H., & Piris, M. A. (2012). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation. *Modern Pathology*, 25(7), 968-982. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.52>
- Morales, D., Beltran, B., De Mendoza, F. H., Riva, L., Yabar, A., Quiñones, P., Butera, J. N., & Castillo, J. (2009). Epstein–Barr virus as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 51(1), 66-72. <https://doi.org/10.3109/10428190903308015>
- Morrison, V. A., Hamlin, P., Soubeyran, P., Stauder, R., Wadhwa, P., Aapro, M., & Lichtman, S. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma in the elderly: Impact of prognosis, comorbidities, geriatric assessment, and supportive care on clinical practice. An International Society of Geriatric Oncology (SIOG) Expert Position Paper. *Journal of Geriatric Oncology*, 6(2), 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2014.11.004>
- Ng, S.-B., & Khoury, J. D. (2009). Epstein-Barr Virus in Lymphoproliferative Processes. *Advances in Anatomic Pathology*, 16(1), 40-55. <https://doi.org/10.1097/pap.0b013e3181916029>

- Nguyen-Van, D., Keane, C., Han, E., Jones, K., Nourse, J. P., Vari, F., Ross, N., Crooks, P., Ramuz, O., Green, M., Griffith, L., Trappe, R., Grigg, A., Mollee, P., & Gandhi, M. K. (2011). Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-cell Lymphoma of the Elderly Expresses EBNA3A With Conserved CD8 T-cell Epitopes. *Am J Blood Res*, 1(2), 146-159. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22432076/#>
- Nimura, M., Uchida, H., Teramoto, A., Sato, J., Matsuoka, A., Tokui, M., Banno, K., Iizuka, A., Yamaguchi, T., & Ozawa, H. (2014). A Case of EBV Positive Diffuse Large B-cell Lymphoma of the Elderly in Stomach Reduced by Itself in a Short Period. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 103(7), 1699-1701. <https://doi.org/10.2169/naika.103.1699>
- Nourse, J. P., Crooks, P., Keane, C., Nguyen-Van, D., Mujaj, S., Ross, N., Jones, K., Vari, F., Han, E., Trappe, R., Fink, S., & Gandhi, M. K. (2012). Expression profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs from paraffin-embedded formalin-fixed primary Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma samples. *Journal of Virological Methods*, 184(1-2), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.005>
- O'Connor, J.-E., Herrera, G., Martínez-Romero, A., de Oyanguren, F. S., Díaz, L., Gomes, A., Balaguer, S., & Callaghan, R. C. (2014). Systems Biology and immune aging. *Immunology Letters*, 162(1), 334-345. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.09.009>
- Ok, C. Y., Li, L., Xu-Monette, Z. Y., Visco, C., Tzankov, A., Manyam, G. C., Montes-Moreno, S., Dybaer, K., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Chen, J., Richards, K. L., Hsi, E. D., Choi, W. W. L., van Krieken, J. H., Huh, J., Ai, W., ... Young, K. H. (2014). Prevalence and Clinical Implications of Epstein-Barr Virus Infection in De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Western Countries. *Clinical Cancer Research*, 20(9), 2338-2349. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-3157>
- Ok, C. Y., Papathomas, T. G., Medeiros, L. J., & Young, K. H. (2013). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood*, 122(3), 328-340. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489708>
- Ok, C. Y., Ye, Q., Li, L., Manyam, G. C., Deng, L., Goswami, R. R., Wang, X., Montes-Moreno, S., Visco, C., Tzankov, A., Dybkaer, K., Zhang, L., Abramson, J., Sohani, A. R., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Richards, K. L., ... Young, K. H. (2015). Age cutoff for Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma-is it necessary? *Oncotarget*, 6(16), 13933-13945. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4324>
- Oki, Y., Ewer, M. S., Lenihan, D. J., Fisch, M. J., Hagemeister, F. B., Fanale, M., Romaguera, J., Pro, B., Fowler, N., Younes, A., Astrow, A. B., Huang, X., Kwak, L. W., Samaniego, F., McLaughlin, P., Neelapu, S. S., Wang, M., Fayad, L. E., Durand, J.-B., & Alma Rodriguez, M. (2015). Pegylated Liposomal Doxorubicin Replacing Conventional Doxorubicin in Standard R-CHOP Chemotherapy for Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: An Open Label, Single Arm, Phase II Trial. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 15(3), 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2014.09.001>
- Oyama, T., Ichimura, K., Suzuki, R., Suzumiya, J., Ohshima, K., Yatabe, Y., Yokoi, T., Kojima, M., Kamiya, Y., Taji, H., Kagami, Y., Ogura, M., Saito, H., Morishima, Y., & Nakamura, S.

- (2003). Senile EBV+ B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(1), 16-26. <https://doi.org/10.1097/00000478-200301000-00003>
- Oyama, T., Yamamoto, K., Asano, N., Oshiro, A., Suzuki, R., Kagami, Y., Morishima, Y., Takeuchi, K., Izumo, T., Mori, S., Ohshima, K., Suzumiya, J., Nakamura, N., Abe, M., Ichimura, K., Sato, Y., Yoshino, T., Naoe, T., Shimoyama, Y., ... Nakamura, S. (2007). Age-Related EBV-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders Constitute a Distinct Clinicopathologic Group: A Study of 96 Patients. *Clinical Cancer Research*, 13(17), 5124-5132. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-2823>
- Ozsan, N., Cagiran, S., Saydam, G., Gunes, A., & Hekimgil, M. (2013). Epstein-Barr virus (EBV) positive diffuse large B cell lymphoma of the elderly—Experience of a single center from Turkey. *Pathology - Research and Practice*, 209(8), 471-478. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.04.014>
- Pan, Y., Meng, B., Zhang, H., Cao, W., Wang, H., Bi, C., Liu, F., Sun, B., Hao, X., Ai, W. Z., & Fu, K. (2012). Low incidence of Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in Tianjin, northern China. *Leukemia & Lymphoma*, 54(2), 298-303. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.715347>
- Park, S., Lee, J., Ko, Y. H., Han, A., Jun, H. J., Lee, S. C., Hwang, I. G., Park, Y. H., Ahn, J. S., Jung, C. W., Kim, K., Ahn, Y. C., Kang, W. K., Park, K., & Kim, W. S. (2007). The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 110(3), 972-978. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-067769>
- Purwanto ,,, I., Kurnianda, J., Hutajulu, S. H., Widayati, K., Rizki, M., & Harijadi. (2006). Epstein-barr nuclear antigen-1 (EBNA-1) in diffuse large B-cell lymphoma and its relationship to the bcl-2 protein. *Acta Med Indones*, 38(2), 77-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16799207/>
- Roschewski, M., & Wilson, W. H. (2012). EBV-associated lymphomas in adults. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 25(1), 75-89. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2012.01.005>
- Rowe, M., & Zuo, J. (2010). Immune responses to Epstein–Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8+ T cell immunity. *Microbes and Infection*, 12(3), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.001>
- Sakata, S., Hamamoto, J., Sugahara, K., Ichiyasu, H., Saita, N., Iyama, K., & Kohrogi, H. (2011). A case of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in an elderly person with a necrotizing pulmonary bulky mass. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 49(11), 833-837. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22171487/>
- Samanta, M., & Takada, K. (2010). Modulation of innate immunity system by EpsteinâBarr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. *Cancer Science*, 101(1), 29-35. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01377.x>
- Sanson, P., Vescovini, R., Fagnoni, F., Biasini, C., Zanni, F., Zanlari, L., Telera, A., Lucchini, G., Passeri, G., Monti, D., Franceschi, C., & Passeri, M. (2008). The immune system in extreme

- longevity. *Experimental Gerontology*, 43(2), 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.06.008>
- Sato, A., Nakamura, N., Kojima, M., Ohmachi, K., Carreras, J., Kikuti, Y. Y., Numata, H., Ohgiya, D., Tazume, K., Amaki, J., Moriuchi, M., Miyamoto, M., Aoyama, Y., Kawai, H., Ichiki, A., Hara, R., Kawada, H., Ogawa, Y., & Ando, K. (2014). Clinical outcome of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in the rituximab era. *Cancer Science*, 105(9), 1170-1175. <https://doi.org/10.1111/cas.12467>
- Shimoyama, Y., Asano, N., Kojima, M., Morishima, S., Yamamoto, K., Oyama, T., Kinoshita, T., & Nakamura, S. (2009). Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders: Diagnostic approach to a newly recognized clinicopathological entity. *Pathology International*, 59(12), 835-843. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2009.02466.x>
- Shimoyama, Y., Oyama, T., Asano, N., Oshiro, A., Suzuki, R., Kagami, Y., Morishima, Y., & Nakamura, S. (2006). Senile Epstein-Barr Virus-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders: a Mini Review. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 46(1), 1-4. <https://doi.org/10.3960/jslrt.46.1>
- Shimoyama, Y., Yamamoto, K., Asano, N., Oyama, T., Kinoshita, T., & Nakamura, S. (2008). Age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: Special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease. *Cancer Science*, 99(6), 1085-1091. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00813.x>
- Shore, D. E., & Ruvkun, G. (2013). A cytoprotective perspective on longevity regulation. *Trends in Cell Biology*, 23(9), 409-420. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.007>
- Song, C.-G., Huang, J.-J., Li, Y.-J., Xia, Y., Wang, Y., Bi, X.-W., Jiang, W.-Q., Huang, H.-Q., Lin, T.-Y., & Li, Z.-M. (2015). Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the Elderly: A Matched Case-Control Analysis. *PLOS ONE*, 10(7), e0133973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133973>
- Stuhlmann-Laeisz, C., Borchert, A., Quintanilla-Martinez, L., Hoeller, S., Tzankov, A., Oschlies, I., Kreuz, M., Trappe, R., & Klapper, W. (2016). In Europe expression of EBNA2 is associated with poor survival in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leukemia & Lymphoma*, 57(1), 39-44. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1040014>
- Sugita, Y., Terasaki, M., Niino, D., Ohshima, K., Fumiko, A., Shigemori, M., Sato, Y., & Asano, N. (2010). Epstein-Barr virus-associated primary central nervous system lymphomas in immunocompetent elderly patients: analysis for latent membrane protein-1 oncogene deletion and EBNA-2 strain typing. *Journal of Neuro-Oncology*, 100(2), 271-279. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0191-z>
- Sukswai, N., Lyapichev, K., Khoury, J. D., & Medeiros, L. J. (2020). Diffuse large B-cell lymphoma variants: an update. *Pathology*, 52(1), 53-67. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.08.013>
- Svec, A., Rangaiah, M., Giles, M., Jaks, R., & McAulay, K. A. (2012). EBV+ diffuse large B-cell lymphoma arising within atrial myxoma. An example of a distinct primary cardiac EBV+



- DLBCL of immunocompetent patients. *Pathology - Research and Practice*, 208(3), 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.12.001>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., & Thiele, J. (2017). *WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Revised 4th Edition ed., Vol. 2). IARC Publications.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20), 2375-2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Thorley-Lawson, D. A., & Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein–Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 350(13), 1328-1337. <https://doi.org/10.1056/nejmra032015>
- Tokuda, Y., Fukushima, M., Nakazawa, K., Oguchi, S., Koganehira, Y., Yamaura, M., Iijima, M., Murata, H., Uhara, H., Takata, M., Saida, T., Katsuyama, T., & Nakamura, S. (2008). A case of primary Epstein-Barr virus-associated cutaneous diffuse large B-cell lymphoma unassociated with iatrogenic or endogenous immune dysregulation. *Journal of Cutaneous Pathology*, 35(7), 666-671. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2007.00859.x>
- Tsuji, H. (2010). Ocular Involvement by Epstein-Barr Virus–Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly: A New Disease Entity in the World Health Organization Classification. *Archives of Ophthalmology*, 128(2), 258. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.381>
- Uccini, S., Al-Jadiry, M. F., Scarpino, S., Ferraro, D., Alsaadawi, A. R., Al-Darraj, A. F., Moleti, M. L., Testi, A. M., Al-Hadad, S. A., & Ruco, L. (2015). Epstein-Barr virus–positive diffuse large B-cell lymphoma in children: a disease reminiscent of Epstein-Barr virus–positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Human Pathology*, 46(5), 716-724. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.01.011>
- UNER, A. Y. S. E. G. U. L., AKYUREK, N. A. L. A. N., SAGLAM, A. R. Z. U., ABDULLAZADE, S. A. M. I. R., UZUM, N. U. K. E. T., ONDER, S. E. V. G. E. N., BARISTA, I. B. R. A. H. I. M., & BENEKLI, M. U. S. T. A. F. A. (2011). The presence of Epstein-Barr virus (EBV) in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) in Turkey: special emphasis on ‘EBV-positive DLBCL of the elderly’. *APMIS*, 119(4-5), 309-316. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02736.x>
- Velankar, M. M., Sydney Sir Philip, J. K., & Venkataraman, G. (2018). An update on high grade B-cell lymphoma. *Diagnostic Histopathology*, 24(7), 237-245. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2018.05.010>
- Ventana Medical Systems, Inc. (2016, 3 octubre). Protocolos anticuerpos de IHQ. CONFIRM Primary Antibody. <https://pim-eservices.roche.com/eLD/web/es/es/home>
- Ventana Medical Systems, Inc. (2017, 28 agosto). Protocolo EBER. INFORM EBER Probe. <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/93b9ba44-6c33-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=es>

- Wada, N., Ikeda, J., Hori, Y., Fujita, S., Ogawa, H., Soma, T., Sugiyama, H., Fukuhara, S., Kanamaru, A., Hino, M., Kanakura, Y., Morii, E., & Aozasa, K. (2010). Epstein-barr virus in diffuse large B-Cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in Western Countries. *Journal of Medical Virology*, 83(2), 317-321. <https://doi.org/10.1002/jmv.21967>
- Wang, E., Papavassiliou, P., & Sebastian, S. (2012). A malignant lymphoma with histological features and immunophenotypic profile intermediate between EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma and EBV-positive classical Hodgkin lymphoma in a 67-year-old female: A “gray zone” lymphoma associated with Epstein-Barr virus in the elderly. *Pathology - Research and Practice*, 208(6), 363-367. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2012.04.003>
- Wang, E., Papavassiliou, P., Wei, Q., Wickham, M. Q., Cichon, L., & Proia, A. D. (2014). An Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma presenting as multi-organ failure: A catastrophic lymphomatosis with fulminant visceral organ dissemination resulting in a precipitous death in a 59-year-old female with no identifiable etiology for immunodeficiency. *Pathology - Research and Practice*, 210(1), 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.09.001>
- Wong, H. H., & Wang, J. (2009). Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leukemia & Lymphoma*, 50(3), 335-340. <https://doi.org/10.1080/10428190902725813>
- Xie, Y., Pittaluga, S., & Jaffe, E. S. (2015). The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Seminars in Hematology*, 52(2), 57-66. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.01.006>
- Xu, F. P., Liu, Y. H., Zhuang, H. G., Luo, D. I., Li, L., Zhang, F., Luo, X. I., Du, X., Li, W. Y., & Chen, Q. (2011). Clinicopathological Features of Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-cell Lymphoma in Elderly. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 40(9), 616-621. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22177246/>
- Xue, T., Wang, W.-G., Zhou, X.-Y., & Li, X.-Q. (2018). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma features PD-L1 protein but not mRNA overexpression. *Pathology*, 50(7), 725-729. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.08.011>
- Yoshino, T., Nakamura, S., Matsuno, Y., Ochiai, A., Yokoi, T., Kitadai, Y., Suzumiya, J., Tobinai, K., Kobayashi, Y., Oda, I., Mera, K., Ohtsu, A., & Ishikura, S. (2006). Epstein-Barr virus involvement is a predictive factor for the resistance to chemoradiotherapy of gastric diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Science*, 97(2), 163-166. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00155.x>
- Ziarkiewicz, M., Wołosz, D., Dzieciatkowski, T., Wilczek, E., Dwilewicz-Trojaczek, J., Jędrzejczak, W. W., Gierej, B., & Ziarkiewicz-Wróblewska, B. (2015). Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B cell Lymphoma in the Experience of a Tertiary Medical Center in Poland. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 64(2), 159-169. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0341-2>

Zoroquiain, P., González, S., Molgó, M., Rodríguez, A., & Valbuena, J. (2012). Leukocytoclastic Vasculitis as Early Manifestation of Epstein-Barr Virus–Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly. *The American Journal of Dermatopathology*, 34(3), 330-334. <https://doi.org/10.1097/dad.0b013e3182318dd9>

**HOJA DE RECOLECCION DATOS****LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES****Siglas del paciente:** \_\_\_\_\_**Sexo:** Hombre: \_\_\_\_\_ Mujer: \_\_\_\_\_**Edad:**

50 – 60 años \_\_, 60 – 70 años \_\_, 70 – 80 años \_\_, 80 – 90 años \_\_, 90 – 100 años \_\_

**Sitio anatómico de presentación:**

Ganglio linfático \_\_\_\_\_

Cervical \_\_ Supraclavicular \_\_ Axilar \_\_ Inguinal \_\_ Mediastinal \_\_ Retroperitoneal \_\_ Abdominal \_\_ Iliaco \_\_ Occipital \_\_ Submandibular \_\_ No especificado \_\_\_\_\_

Bazo \_\_ Hígado \_\_ Mediastino \_\_ Retroperitoneo \_\_ TGI \_\_ Bronquio \_\_ Tórax \_\_

**Hallazgos morfológicos sugestivos de infección por VEB:**

Necrosis geográfica \_\_ Angioinvasión \_\_ Morfología plasmacítica \_\_

Células similares a células de Reed-Sternberg \_\_

Infiltrado monomorfo \_\_ polimorfo \_\_

**Expresión de marcadores de inmunohistoquímica:**

CD20 \_\_\_\_\_ CD10 \_\_\_\_\_ CD30 \_\_\_\_\_ BCL-2 \_\_\_\_\_ BCL-6 \_\_\_\_\_ MUM1/IRF4 \_\_\_\_\_

LMP1 \_\_\_\_\_ c-MYC \_\_\_\_\_

**Expresión de marcadores de hibridación in situ:** EBER \_\_\_\_\_**Índice de proliferación dado por expresión de Ki-67:** 0 – 100% \_\_\_\_\_**Compromiso de la médula ósea:** Presente \_\_\_\_\_ Ausente \_\_\_\_\_